



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Piotr Ciesielski

**Dioksygenazy TET i O-GlcNAc
transferaza w progresji
nowotworów endometrium**

TET dioxygenases and O-GlcNAc transferase
in the progression of endometrial cancers

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Cytobiochemii
Instytutu Biochemii

Promotor:
Dr hab. Anna Krześlak, prof. UŁ

Promotor pomocniczy:
Dr Paweł Józwiak

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie, zostały sfinansowane ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki na projekt:

- ❖ „Rola wzajemnych zależności między TET3 i O-GlcNAc transferazą w progresji nowotworów” (UMO-2015/19/N/NZ3/01311), Preludium 10, 2016 – 2020, 150000,00 PLN;

we wsparciu finansowym Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego przyznany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego w ramach dotacji na działalność polegającą na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na projekty:

- ❖ „Wpływ zmniejszonej i zwiększonej ekspresji TET3 na ekspresję genów zaangażowanych w metastazę komórek raka endometrium”. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2018 r., kod projektu B1811000001805.02, 6842,00 PLN;
- ❖ „Wpływ zmienionej ekspresji TET3 na ekspresję i lokalizację OGT oraz na ekspresję genów zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórek raka piersi i endometrium”. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2017 r., kod projektu B1711000001520.02, 6306,00 PLN;
- ❖ „Wpływ wyciszenia genu OGT na ekspresję, lokalizację i modyfikacje TET1 i TET3”. Dotacja celowa dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w 2016 r., kod projektu B1611000001172.02, 7214,00 PLN.



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódźki



**UNIWERSYTET
ŁÓDZKI**



NARODOWE CENTRUM NAUKI



**Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego**

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	3
2.	Wstęp	6
3.	Dioksygenazy TET	7
3.1.	Struktura białek TET i czynniki wpływające na ich aktywność	8
3.2.	Białka TET a proces demetylacji DNA	12
3.2.1	Demetylacja aktywna	12
3.2.2	Demetylacja pasywna	14
3.3.	Wpływ interakcji białek TET z innymi białkami na modyfikacje epigenetyczne	15
3.4.	Białka TET a proces nowotworzenia	18
4.	Proces O-GlcNAcytacji	22
4.1.	Enzymy zaangażowane w cykl O-GlcNAcytacji	23
4.1.1	OGT	23
4.1.2	OGA	25
4.2.	Zaburzenia O-GlcNAcytacji w komórkach nowotworowych	26
4.2.1	O-GlcNAcyłacja a metabolizm komórek nowotworowych	27
4.2.2	O-GlcNAcyłacja a przekazywanie sygnału	29
4.2.3	O-GlcNAcyłacja a progresja nowotworów	31
5.	Założenia i cel pracy	34
6.	Materiał	36
6.1.	Materiał kliniczny	36
6.2.	Linie komórkowe	37
7.	Metody	37
7.1.	Hodowla komórkowa	37
7.2.	Wyciszenie ekspresji TET3 i OGT	37
7.3.	Zwiększenie ekspresji TET3 i OGT z wykorzystaniem wektorów plazmidowych	38
7.4.	Zmiana ekspresji TET3 i OGT w różnych wariantach (kotransfekcja)	38
7.5.	Otrzymywanie lizatów komórkowych	38
7.6.	Izolowanie RNA z preparatów tkankowych	39
7.7.	Izolowanie RNA z lizatów komórkowych	39
7.8.	Spektrofotometryczna analiza czystości i stężenia RNA	40
7.9.	Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)	40
7.10.	Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR)	40
7.11.	Izolacja frakcji cytoplazmatycznej, nukleoplazmatycznej i chromatynowej	43
7.12.	Immunoprecypitacja chromatyny	44

7.13.	Izolacja DNA z próbek po immunoprecypitacji chromatyny	47
7.14.	Western Blotting	47
7.14.1	Przygotowanie białek do elektroforezy	47
7.14.2	Elektroforeza	48
7.14.3	Transfer białek na membranę Immobilonu-P	48
7.14.4	Barwienie białek po elektrotransferze	48
7.14.5	Immunodetekcja białek metodą chemiluminescencji.....	48
7.15.	Określenie potencjału komórek do migracji – „Wound healing assay”	50
7.16.	Określenie potencjału komórek do migracji i inwazyjności – „Transwell assay” 50	
7.17.	Analiza statystyczna.....	51
8.	Omówienie wyników badań prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	52
8.1.	Ekspresja TET1, TET2 i TET3 w raku endometrium	53
8.2.	Korelacja między poziomami 5-mC i 5-hmC a ekspresją TET	53
8.3.	Ekspresja TET1 a rokowanie pacjentek z rakiem endometrium	54
8.4.	Ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcytacji (OGT i OGA) w raku endometrium	54
8.5.	Ekspresja genów EMT w raku endometrium	55
8.6.	Wpływ OGT i TET3 na ekspresję genów zaangażowanych w EMT	55
8.7.	Wpływ nadekspresji TET3 na ilość i komórkową lokalizację OGT w komórkach raka endometrium	56
8.8.	Współzależność między TET3 i OGT na ich zdolność wiązania się do chromatyny i modyfikację histonów	56
8.9.	Wpływ zwiększonej ekspresji OGT i TET3 na migrację i inwazję komórek raka endometrium	57
8.10.	Korelacje między ekspresją genów EMT a OGT lub TET3 w raku endometrium 57	
9.	Dyskusja	59
9.1.	Podsumowanie i wnioski	66
10.	Streszczenie	68
11.	Abstract.....	69
12.	Bibliografia.....	71
13.	Załączniki	95

1. Wykaz skrótów

14-3-3β	Białko należące do zachowanej ewolucyjnie rodziny cząstek regulatorowych, które ulegają ekspresji we wszystkich komórkach eukariotycznych
2-HG	2-hydroksyglutaran
2-KG	2-ketoglutaran
3'UTR	Niepodlegająca translacji część mRNA położona w kierunku 3' od sekwencji kodującej (ang. 3' untranslated region)
5-caC	5-karboksylocytozyna (ang. 5-carboxylcytosine)
5-fC	5-formylocytozyna (ang. 5-formylcytosine)
5-hmU	5-hydroksymetylouracyl (ang. 5-hydroxymethyluracil)
AID/APOBEC	Rodzina białek deaminaz DNA; kompleks białkowy o aktywności enzymatycznej, powodujący deaminację cytydyny (ang. activation induced deaminase and apolipoprotein B RNA editing catalytic component)
AML	Ostra białaczka szpikowa (ang. acute myeloid leukemia)
AMPK	Kinaza aktywowana przez AMP (ang. 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase)
AT	Ataksja teleangiektazja (ang. Ataxia telangiectasia)
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Kinaza białkowa (ang. Ataxia telangiectasia mutated)
ATR	Kinaza białkowa (ang. Ataxia telangiectasia and Rad3 related)
BER	System naprawy DNA przez wycinanie zasad (ang. base excision repair)
BRN2	Czynnik transkrypcyjny odgrywający ważną rolę w procesie neurogenezy (ang. tissue-restricted POU domain transcription factor)
CDK5	Cyklinozależna kinaza 5(ang. Cyclin-dependent kinase 5)
ChIP-Seq	Immunoprecypitacja chromatyny w połączeniu z jednoczesnym sekwencjonowaniem DNA (ang. chromatin immunoprecipitation sequencing)
DLBCL	Chłoniak rozlany z dużych komórek B (ang. diffuse large B-cell lymphoma)
DNMT1	DNA-metylotransferaza 1 (ang. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1)
DNMT3a	DNA-metylotransferaza 3a (ang. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3a)
DNMT3b	DNA-metylotransferaza 1 (ang. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3b)
Drp1	Białko podobne do dynaminy 1 o właściwości GTPazy (ang. dynamin related protein 1)
DSBH	Domena katalityczna białek TET, mająca zdolność do wiązania jonów metali (ang. double-stranded β -helix-2-KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain)
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EMT	Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition)
ESCs	Embrionalne komórki macierzyste (ang. embryonic stem cells)

EZH2	Składnik kompleksu PRC2 u człowieka; metylotransferaza histonowa (ang. enhancer of zeste homolog 2)
FH	Fumaraza (ang. fumarate hydratase)
FL	Chłoniak grudekowy (ang. follicular lymphoma)
FOX	Rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. Forkhead transcription factors)
GH84	Domena o aktywności N-acetyloglukozaminidazy (ang. glycoside hydrolase family 84)
GlcNAc	β -N-acetylo-D-glukozamina (ang. N-acetylglucosamine)
GSC	Komórki macierzyste glejaka (ang. glioblastoma stem cells)
HAT	Acetylotransferaza histonowa (ang. histone acetyltransferase)
HBP	Szlak biosyntezy heksozamin (ang. hexosamine biosynthesis pathway)
HDAC	Deacetylaza histonowa (ang. histone deacetylase)
HK	Heksokinaza (ang. hexokinase)
hMOF	Acetylotransferaza histonowa, specyficzna dla lizyny 16 na histonie H4 (ang. histone H4 lysine K16-specific acetyltransferase)
IDH	Dehydrogenaza izocytrynianowa (ang. isocitrate dehydrogenase)
LSD1	Lizyno-specyficzna demetylaza 1 (ang. lysine-specific Demethylase 1)
LIG3	Ligaza DNA (ang. DNA ligase 3)
MBD4	Białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG (ang. methyl-CpG binding domain protein 4)
MDS	Zespół mielodysplastyczny (ang. myelodysplastic syndrome)
MeCP2	Białko wiążące zmetylowane dinukleotydy CpG 2 (ang. methyl CpG binding protein 2)
mESC	Mysie embrionalne komórki macierzyste (ang. mouse embryonic stem cells)
MGEA5	Gen kodujący β -N-acetylo-D-glukozaminidazę (ang. meningioma expressed antigen 5)
MLL	Białko fuzyjne, którego mutacje obserwowane są w białaczkach (ang. Mixed lineage leukemia)
MLS	Sekwencja lokalizacji mitochondrialnej (ang. mitochondrial localization sequence)
mOGT	Mitochondrialna izoforma O-GlcNAc transferazy (ang. mitochondrial OGT)
MPN	Nowotwory mieloproliferacyjne (ang. myeloproliferative neoplasms)
NAD	Forma utleniona dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide)
NADPH	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
ncOGT	Długa izoforma O-GlcNAc transferazy mająca lokalizację jądrowo-cytoplazmatyczną (ang. nucleocytoplasmic OGT)
NEIL	Glikozylaza DNA (ang. nei endonuclease VIII-like)
NLS	Sekwencja lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization sequence)
OGA	β -N-acetylo-D-glukozaminidaza (ang. O-GlcNAcase)
OGA-L	Długa izoforma β -N-acetylo-D-glukozaminidazy (ang. OGA long form)
OGA-S	Krótka izoforma β -N-acetylo-D-glukozaminidazy (ang. OGA short form)
OGT	O-GlcNAc transferaza (ang. O-linked N-acetylglucosamine transferase)
p300	Acetylotransferaza histonowa
PARP1	Polimeraza poli-ADP-rybozy (ang. poly (ADP-ribose) polymerase 1)

<i>Pax7</i>	Gen kodujący czynnik transkrypcyjny, odgrywający ważną rolę w czasie miogenezy
PCNA	Jądrowy antigen dzielącej się komórki (ang. proliferating cell nuclear antigen)
PFK1	Fosfofruktokinaza 1 (ang. phosphofructokinase 1)
PKM1	Izoforma M1 kinazy pirogronianowej; charakterystyczna dla komórek prawidłowych (ang. pyruvate kinase isoform M1)
PKM2	Izoforma M2 kinazy pirogronianowej; charakterystyczna dla komórek nowotworowych (ang. pyruvate kinase isoform M2)
PPP	Szlak pentozofosforanowy (ang. pentose phosphate pathway)
PRC2	Kompleks represyjny Polycomb 2 (ang. Polycomb repressive complexes 2)
Sin3A	Czynnik transkrypcyjny (ang. Sin3 transcription regulator family member A)
SIRT1	NAD-zależna deacetylaza sirtuina 1 (ang. Sirtuin 1)
SLUG1	Glikozylaza uracyl-DNA (ang. single strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase)
sOGT	Krótką izoforma O-GlcNAc transferazy (ang. short OGT)
TDG	Glikozylaza tymina-DNA (ang. mismatch specific thymine DNA glycosylase)
TET	Białko katalizujące hydroksylację 5-metylocytozyny (ang. ten-eleven translocation)
TPR	Tandemowo ułożone powtórzenia peptydowe (ang. tetratricopeptide repeats)
<i>TWIST1</i>	Gen kodujący białko TWIST1 (ang. Twist-related protein 1)
<i>TWIST2</i>	Gen kodujący białko TWIST2 (ang. Twist-related protein 2)
UHRF1	Białko podobne do ubikwityny, zawierający domeny palcowe PHD i RING, 1 (ang. ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1)
VIM	Gen kodujący wimentynę (ang. Vmentine)
XRCC1	Białko biorące udział w naprawie DNA, tworzy kompleks z LIGG3 (ang. X-ray repair cross-complementing protein 1)
<i>ZEB1</i>	Gen kodujący białko ZEB1 (ang. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1)
<i>ZEB2</i>	Gen kodujący białko ZEB2 (ang. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2)

2. Wstęp

Jednym z podstawowych sposobów epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest metylacja cytozyny w DNA. Metylacja cytozyny w łańcuchu DNA zachodzi, gdy znajduje się ona w sąsiedztwie guaniny (dinukleotydy CpG). Dinukleotydy CpG mogą być rozproszone w genomie lub występować w skupiskach w postaci tzw. wysp CpG. Metylacja wysp CpG zlokalizowanych w regionach promotorowych genów jest odpowiedzialna za wyciszenie ekspresji genów [Ooi i wsp. 2009, Sarkies i Sale 2012]. Wyniki wielu badań wykazały, że komórki nowotworowe charakteryzują się znacznymi zmianami we wzorze metylacji DNA w porównaniu z komórkami prawidłowymi. W komórkach nowotworowych obserwuje się globalną hipometylację genomu przy jednoczesnym zwiększeniu poziomu metylacji (hipermetylacji) wysp CpG w sekwencjach promotorowych określonych genów. Globalna hipometylacja może prowadzić do aktywacji protoonkogenów oraz zmniejszenia stabilności genomu poprzez wzrost aktywacji transpozonów, które normalnie są wyciszone przez metylację. Z kolei hipermetylacja wysp CpG w regionach promotorowych genów supresorowych oraz genów naprawy DNA przyczynia się do nowotworzenia wskutek zahamowania ekspresji tych genów [Dawson i wsp. 2012, Suvà i wsp. 2013]. Znaczącą rolę w zmianach wzoru metylacji DNA, poprzez udział w demetylacji DNA, odgrywają stosunkowo niedawno poznane białka TET. U człowieka zidentyfikowano trzy białka TET określone, jako TET1, TET2 i TET3, które katalizują konwersję 5-metylocytozyny (5-mC) do 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC) oraz dalej do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksycytozyny (5-caC), co zapoczątkowuje proces demetylacji DNA. Demetylacja DNA może być procesem pasywnym lub aktywnym. W obu przypadkach białka TET odgrywają znaczącą rolę [Guo i wsp. 2011, Ito i wsp. 2011, Kroeze i wsp. 2015]. Oprócz udziału w demetylacji DNA, białka TET mogą wpływać na modyfikacje epigenetyczne niezależnie od swojej aktywności enzymatycznej przez interakcje z innymi białkami zaangażowanymi w modyfikacje chromatyny, np. OGT [Chen i wsp. 2013, Ito i wsp. 2014, Zhang i wsp. 2014].

OGT jest enzymem odpowiadającym za modyfikacje białek komórkowych przez przyłączenie pojedynczych reszt N-acetylglukozaminy wiązaniem O-glikozydowym do reszt seryny lub treoniny białka. Ta dynamiczna modyfikacja wpływa na aktywność, stabilizację i lokalizację szeregu białek m.in. enzymów metabolicznych, kinaz, fosfataz, czynników transkrypcyjnych i wielu innych [Hart i wsp. 2011]. Zwiększenie ekspresji OGT i hiper-O-GlcNAcylocja są cechami charakterystycznymi większości nowotworów [De

Queiroz i wsp. 2014]. Ostatnie badania wskazały, że O-GlcNAcyłacja może stanowić element kodu histonowego. OGT modyfikuje histony H2A, H2B, H3 i H4 przez co wpływa na transkrypcję genów i progresję cyklu komórkowego [Sakabe i wsp. 2010].

Obecnie nie ulega wątpliwości, że w powstawaniu i progresji nowotworów istotną rolę odgrywają czynniki epigenetyczne. Zmiany metylacji DNA czy modyfikacji histonów mogą prowadzić do wyciszenia genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę i naprawę DNA, a także prowadzić do angiogenezy i przerzutowania. Z tego względu poznanie mechanizmów związanych z utrzymaniem prawidłowego wzoru modyfikacji epigenetycznych może mieć ogromne znaczenie dla lepszego zrozumienia procesów transformacji nowotworowej i w konsekwencji przyczynić się do opracowania nowych metod w diagnostyce i terapii nowotworów.

3. Dioksygenazy TET

U człowieka zidentyfikowano trzy białka TET (ang. ten-eleven translocation), określone jako TET1, TET2 i TET3. Są to duże białka o wielkości ok. 182-235 kDa. Wszystkie białka TET są dioksygenazami, a ich główna aktywność enzymatyczna polega na hydroksylacji 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny oraz dalej do 5-formylocytozyny (5-fC) i 5-karboksycytozyny (5-caC) [Liu i wsp. 2019]. Mechanizm ten zostanie dokładniej opisany w kolejnych rozdziałach.

Białka TET kodowane są przez trzy różne geny. Gen *TET1* zlokalizowany jest w chromosomie 10 (10q21.3), składa się z dwunastu eksonów i koduje białko zawierające 2136 reszt aminokwasowych [Abdel-Wahab i wsp. 2009]. Gen *TET2* znajduje się w chromosomie 4 (4q24) i składa się z 11 eksonów. W procesie alternatywnego składowania mRNA powstają trzy izoformy białka TET2, zawierające 2002, 1164 lub 1194 reszt aminokwasowych. Tylko najdłuższa izoforma TET2 zawiera C-kończową domenę katalityczną. Wszystkie trzy izoformy TET2 charakteryzują się swoistą tkankowo ekspresją. W większości typów tkanek najmniejszą ekspresję wykazuje izoforma 3 (1194 aminokwasów), natomiast dwie pozostałe ulegają ekspresji na podobnym poziomie. Szczególnie dużą ekspresję izoform zawierających 2002 i 1164 reszt aminokwasowych obserwuje się w komórkach hematopoetycznych [Jankowska i wsp. 2009, Langemeijer i wsp. 2009]. Gen *TET3* umiejscowiony jest w chromosomie 2 (2p13.1) i podobnie jak w przypadku TET2 zidentyfikowano trzy izoformy białka TET3, zawierające 1660, 1440 lub 728 reszt aminokwasowych [Mohr i wsp. 2011].

Białka TET mogą przekształcać 5-hmC dalej do 5-formylocytozyny i 5-karboksycytozyny, aczkolwiek ilość w genomie tak zmodyfikowanych cytozyn jest około stukrotnie mniejsza niż 5-hmC. Niemniej jednak, zarówno 5-fC, jak i 5-caC, odgrywają ważną rolę w demetylacji DNA będąc swoistymi substratami glikozylazy TDG. Inne glikozylazy nie wykazują zdolności do wycinania tych pochodnych cytozyny [Ito i wsp. 2011, Maiti i Drohat 2011]. Mimo że glikozylaza TDG może wycinać z DNA pochodne 5-hmC (5-hmU, 5-fC i 5-caC), to nie wykazuje aktywności względem par 5-hmC:G. Wskazuje to na istotny udział procesu deaminacji, który poprzedza wycinanie błędnie sparowanych zasad, w systemie naprawy DNA typu BER [He i wsp. 2011, Maiti i Drohat 2011].

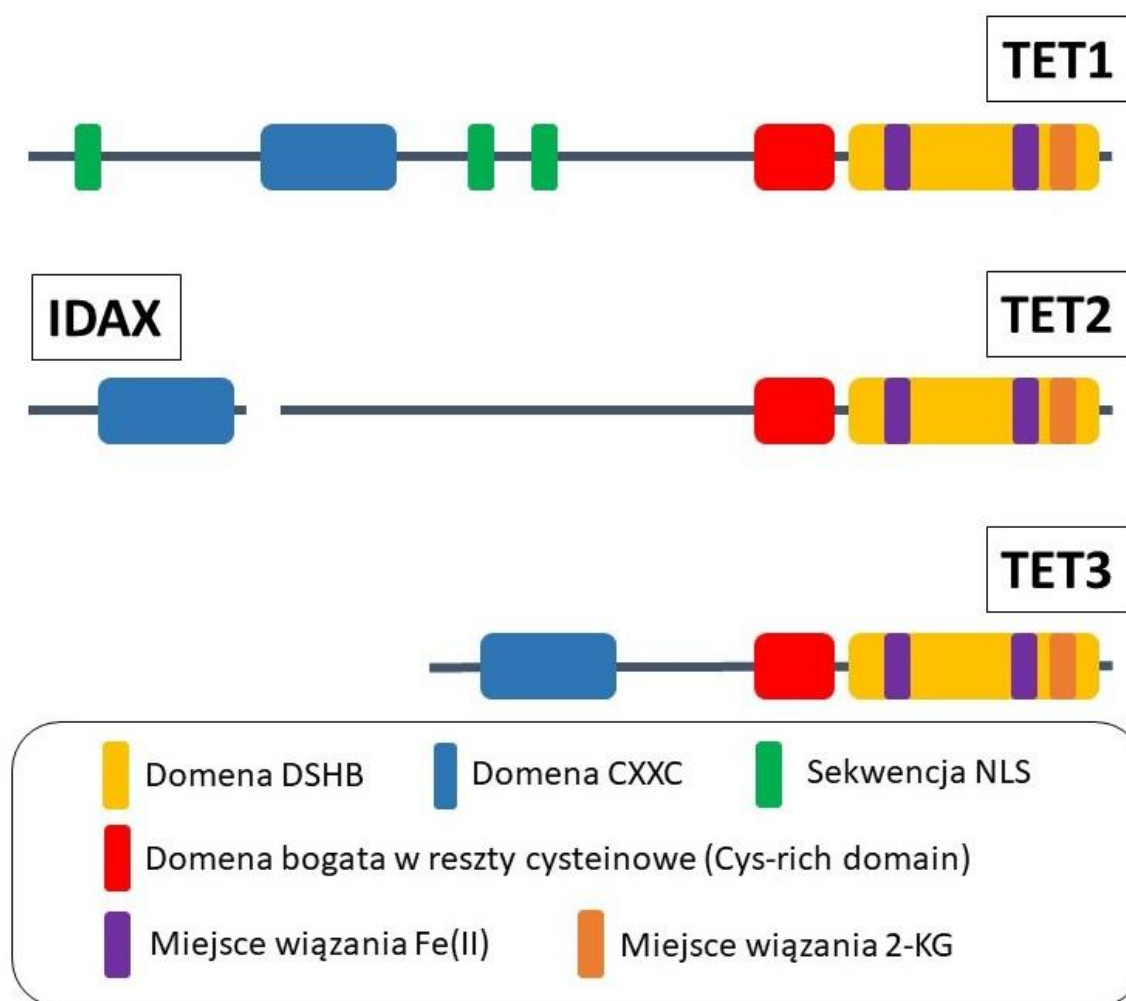
Zawartość 5-hmC w organizmie człowieka jest różna w zależności od rodzaju tkanki oraz etapu rozwoju organizmu – dla porównania ilość 5-mC jest bardzo podobna w różnych tkankach i dotyczy około 5% wszystkich cytozyn. Największa ilość 5-hmC występuje w embrionalnych komórkach macierzystych (ESCs, ang. embryonic stem cells) oraz w ośrodkowym układzie nerwowym [Globisch i wsp. 2010, Ito i wsp. 2010]. Tkanki, takie jak wątroba, jelito grube, nerki, czy odbytnica charakteryzują się umiarkowaną zawartością 5-hmC. Natomiast najmniej 5-hmC wykryto w sercu, płucach, łożysku i piersiach [Li i Liu 2011].

Zawartość 5-hmC różni się również na poziomie samego DNA. Największą ilość tej zmodyfikowanej cytozyny obserwuje się głównie w obrębie eksonów i wysp CpG znajdujących się wewnątrz genów. Z kolei najmniejszą ilością mamy do czynienia w regionach intronowych występujących w promotorach genów [Booth i wsp. 2012]. W przypadku mysich embrionalnych komórek macierzystych zaobserwowano, że 5-hmC jest umiejscowiona głównie w luźno upakowanej, aktywnej chromatynie, co sugeruje się, że 5-hmC odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji i aktywności genów związanych z pluripotencją komórek ESC oraz w zmianach epigenetycznych w nich zachodzących [Ficz i wsp. 2011, Xu i wsp. 2011b]. Różnice w poziomie 5-hmC, spowodowane zmianami w poziomie ekspresji genów TET, najprawdopodobniej przyczyniają się do regulacji określonych genów na danych etapach rozwoju embrionalnego [Iqbal i wsp. 2011, Wossidlo i wsp. 2011].

3.1. Struktura białek TET i czynniki wpływające na ich aktywność

W strukturze białek TET znajdują się trzy miejsca wiążące jony żelaza-(II) oraz jedno miejsce pozwalające na związanie 2-KG. Region odpowiedzialny za aktywność katalityczną

znajduje się na C-końcu białek TET. Składa się z dwóch domen: bogatej w reszty cysteinowe (Cys-rich domain) oraz domeny DSBH (ang. double-stranded β -helix-2-KG-Fe(II)-dependent dioxygenase domain), która oprócz właściwości katalitycznych może również wiązać jony metali. Białko TET1 jako jedyne posiada w swojej strukturze trzy sekwencje lokalizacji jądrowej (ang. NLS, nuclear localization sequence) [Tahiliani i wsp. 2009]. Na N-końcu białek TET1 i TET3 znajduje się domena CXXC, o strukturze palca cynkowego, zdolna do wiązania zarówno niezmodyfikowanych, jak i metylowanych lub hydroksymetylowanych cytozyn, zwłaszcza znajdujących się w obrębie dinukleotydów CpG [Zhang i wsp. 2010, Stroynowska-Czerwinska i wsp. 2018]. TET2 utraciło swoją domenę CXXC w wyniku inwersji chromosomalnej w obrębie genu *TET2*. Jest ona kodowana przez osobny gen – *IDAX*. Domena CXXC *IDAX* wiąże się do sekwencji DNA i oddziałuje bezpośrednio z domeną katalityczną TET2, co umożliwia tej dioksygenazie połączenie się do DNA i hydroksylację 5-mC [Ko i wsp. 2013]. Mimo odmienności N-końcowy fragment białka TET2 zdaje się mieć duży wpływ na stabilność tego białka. Wyniki badań wskazują, że zarówno acetylacja lizyny 110 przez acetylotransferazę p300 [Zhang i wsp. 2017], czy fosforylacja seryny 99 przez kinazę AMPK (ang. AMP-activated protein kinase) [Wu i wsp. 2018] prowadzą do zwiększenia stabilności białka TET2. Mutacje dotyczące N-końca białka TET2 prowadzące do braku wspomnianej powyżej fosforylacji przyczyniają się do utraty stabilności białka [Chen i wsp. 2019]. Ponadto, zaobserwowano, że białka z rodziny 14-3-3 wiążą się do i zabezpieczają ufosforylowaną serynę 99, a inhibicja 14-3-3 prowadzi do utraty stabilności TET2. Dokładny mechanizm tego działania nie jest do końca poznany i wymaga dalszych badań [Chen i wsp. 2019, Kundu i wsp. 2020].



Rysunek 1 Struktura domenowa izoform białek TET

Na aktywność białek TET wpływa obecność jonów żelaza(II) oraz 2-ketoglutaranu (2-KG). 2-KG, będący substratem białek TET, powstaje podczas cyklu kwasów trikarboksylowych, a wytwarzany jest przez zależne od NADP⁺, homodimeryczne enzymy zwane dehydrogenazami izocytrynianowymi (ang. IDHs, isocitrate dehydrogenases). W przemianie izocytrynianu w 2-KG uczestniczą dwie izoformy IDH - izoforma cytosolowa (IDH1) i mitochondrialna (IDH2) [Chotirat i wsp. 2015]. W związku z tym, że na aktywność białek TET wpływa 2-KG, sugeruje się, że mutacje w genach kodujących dehydrogenazę izocytrynianową mogą wpływać na zmniejszenie aktywności katalitycznej białek TET, a co za tym idzie zmniejszoną konwersję 5-mC do 5-hmC. Dzieje się tak, ponieważ zmutowane warianty IDH zamiast 2-KG wytwarzają 2-hydroksyglutaran (2-HG). 2-HG wykazuje podobieństwo strukturalne do 2-KG powodując zahamowanie funkcji wszystkich białek TET, jak również innych dioksygenaz na zasadzie inhibicji kompetycyjnej [Dang i wsp. 2010, Xu i wsp. 2011a]. Wyciszenie genów kodujących fumarazę (ang. FH, fumaran

hydratase) i/lub dehydrogenazę bursztynianową (ang. SDH, succinate dehydrogenase), lub mutacje tych genów obserwowane w nowotworach, również prowadzą do zahamowania aktywności katalitycznej białek TET, a co za tym idzie obniżenia poziomu 5-hmC, poprzez nagromadzenie w komórkach produktów pośrednich cyklu Krebsa jakimi są kwas fumarowy i bursztynian [Xiao i wsp. 2012, Laukka i wsp. 2015].

Badania wskazują, że korzystny wpływ na aktywność białek TET może wywoływać kwas askorbinowy (witamina C). Oddziałuje on z C-końcową domeną katalityczną białek TET, co przypuszczalnie wpływa na zmianę jej struktury, umożliwiając/ułatwiając wiązanie jonów żelaza(II). Nie wykazano, aby inne przeciwutleniacze wywierały podobny wpływ na aktywność białek TET, co wskazuje, że aktywacja TET przez kwas askorbinowy nie wynika tylko z jego funkcji jako czynnika redukującego [Minor i wsp. 2013, Yin i wsp. 2013]. W komórkach z wyciszoną ekspresją *TET1/2* obecność kwasu askorbinowego nie wpływa ani na zwiększenie oksydacji 5-mC, ani na ogólny poziom tej modyfikacji. Natomiast stwierdzono, że zmniejszenie stężenia kwasu askorbinowego przy prawidłowej ekspresji genów *TET* wpływa znacząco na zmniejszenie stężenia 5-hmC w płucach, wątrobie i mózgu, ale prawdopodobnie również i w innych tkankach [Blaschke i wsp. 2013, Yin i wsp. 2013].

Dużą rolę w regulacji aktywności białek TET odgrywają modyfikacje potranslacyjne, wpływając na wewnątrzkomórkową lokalizację tych białek, ich zdolność do wiązania się z chromatyną oraz aktywność enzymatyczną. Monoubikwitynylacja białek TET na zachowanej ewolucyjnie reszcie lizyny wpływa na ich zdolność do wiązania się z chromatyną i pełni kluczową rolę w procesie rozwoju organizmów oraz procesie nowotworzenia [Nakagawa i wsp. 2015]. Acetylacja dwóch zachowanych ewolucyjnie reszt lizyny na N-końcu TET2 stabilizuje białko, zwiększa jego aktywność enzymatyczną i ułatwia jego lokalizację w chromatynie podczas stresu oksydacyjnego [Zhang i wsp. 2017]. Poli-ADP-rybozylacja domeny katalitycznej TET1 wpływa na zmniejszenie aktywności enzymatycznej tego białka [Ciccarone i wsp. 2015]. Na interakcje białek TET z innymi białkami mają wpływ modyfikacje potranslacyjne. Wszystkie 3 białka TET mogą ulegać zarówno O-GlcNAcytacji, jak i fosforylacji [Shi i wsp. 2013, Zhang i wsp. 2014, Bauer i wsp. 2015, Jiang i wsp. 2015]. W większości przypadków dane reszty aminokwasowe ulegają albo fosforylacji, albo O-GlcNAcytacji, jednakże występują również takie reszty seryny, które mogą podlegać obu wspomnianym typom modyfikacji. Przykładem może być seryna 362 (Ser263), która w zależności od tego, czy jest ufosoforylowana, czy O-GlcNAcylowana może powodować promowanie lub hamowanie modyfikacji

znajdujących się w pobliżu reszt aminokwasowych, a co za tym idzie, może stanowić ważny element wpływający na regulację aktywności lub stabilności TET3 [Bauer i wsp. 2015].

Aktywność białek TET zależy również od samej ich zawartości w komórkach. Udział w regulacji ekspresji genów *TET* może zależeć od różnej ekspresji mikroRNA (miRNA), których zaburzona ekspresja jest często obserwowana w przypadku nowotworów. Istnieje kilka miRNA, które mają bezpośredni wpływ na poziom transkrypcji genów *TET*. Możemy tu wyróżnić m.in. miR-29, miR-26, miR-22, miR-101, miR-105, miR-125 i miR767 [Cheng i wsp. 2013, Fu i wsp. 2013, Song i wsp. 2013b, Zhang i wsp. 2013]. Większość z tych miRNA wykazuje wpływ na ekspresję wszystkich trzech genów *TET*, jednakże niektóre z nich charakteryzują się specyficznym działaniem względem konkretnego genu *TET*. Zaobserwowano, że miR-29 wykazuje największe powinowactwo do wiązania się z transkryptami TET3 w ludzkich fibroblastach i komórkach mięśniowych naczyń krwionośnych [Zhang i wsp. 2013]. W liniach komórkowych czerniaka wykazano, że miR-767 może działać jako regulator komórkowych poziomów 5-hmC poprzez oddziaływanie ze wszystkim genami *TET*, jednakże preferencyjny wpływ wykazuje względem *TET1* [Loriot i wsp. 2014]. Oddziaływania między miRNA a TET mogą także wywierać wpływ na proces nowotworzenia. Przykładowo wzrost poziomu miR-22 obserwowany w przypadku raka piersi prowadzi do spadku ekspresji genów TET. Powoduje do wzrost poziomu metylacji regionu promotorowego miR-200 obniżając jego ekspresję. Zaobserwowano, że oddziaływania te wpływają na zwiększenie zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania [Song i wsp. 2013a, Song i wsp. 2013b].

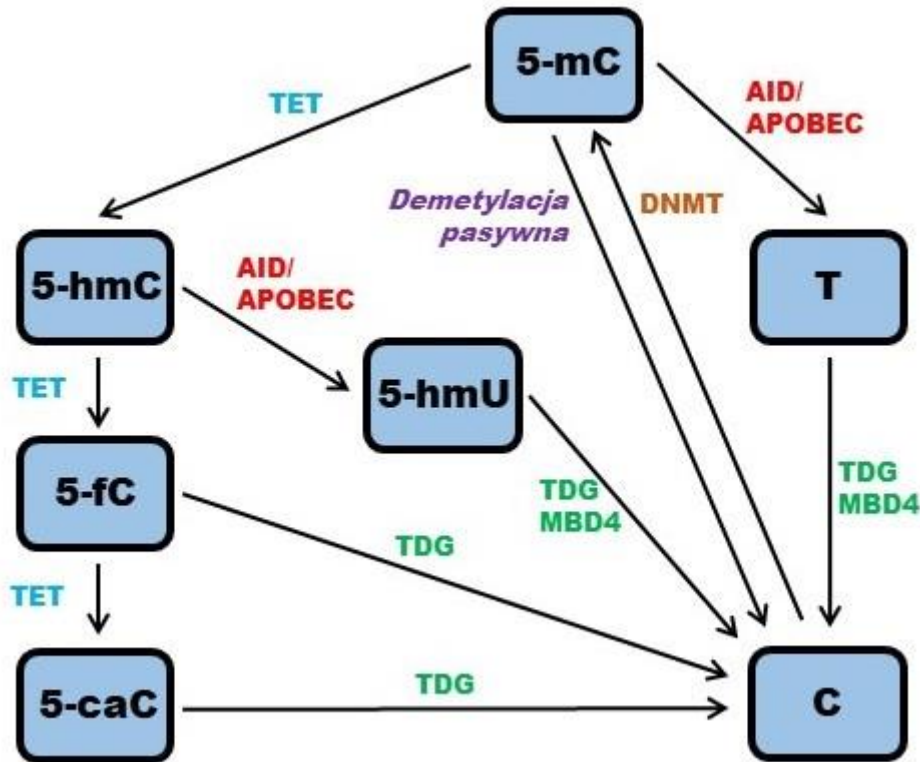
3.2. Białka TET a proces demetylacji DNA

3.2.1 Demetylacja aktywna

Białka TET biorą udział zarówno w demetylacji DNA aktywnej, jak i pasywnej. Aktywna demetylacja DNA z udziałem białek TET jest procesem kilkietapowym i przebiega niezależnie od replikacji. W pierwszym etapie 5-mC i 5-hmC ulegają deaminacji przez białka z rodziny AID/APOBEC (ang. activation induced deaminase and apolipoprotein B RNA editing catalytic component) odpowiednio do tyminy i 5-hydroksymetylouracylu (5-hmU) [Guo i wsp. 2011, Nabel i wsp. 2012]. Nadekspresja genu kodującego białko AID/APOBEC prowadzi do wzrostu poziomu 5-hmU poprzez nasilony proces demetylacji 5-hmC, natomiast nie obserwuje się równoczesnej zmiany w poziomie 5-mC. Z kolei zwiększenie ekspresji zarówno *AID/APOBEC*, jak i *TET1* wpływa istotnie na zwiększenie

demetylacji 5-mC co jest spowodowane nasiloną przemianą 5-mC do 5-hmC ze względu na nadekspresję *TET1*. Dane te świadczą o tym, że deaminaza AID/APOBEC oddziałuje swoiście tylko na 5-hmC, a nie na 5-mC [Guo i wsp. 2011]. Powstałe w skutek działania AID/APOBEC tymina i 5-hmC są usuwane z DNA przy udziale glikozylaz TDG (ang. mismatch specific thymine DNA glycosylase) i SLUG1 (ang. single strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase), a następnie są zastępowane cytozyną. Jest to tzw. system naprawy DNA przez wycinanie zasad BER (ang. base excision repair) [Hashimoto i wsp. 2012a, Niehrs i Schäfer 2012]. Ważną rolę w procesie demetylacji aktywnej odgrywa także białko MBD4 (ang. methyl-CpG binding domain protein 4). Białko to ma w swojej strukturze zarówno domenę, która umożliwia wiązanie się do zmetylowanych dinukleotydów CpG, jak również domenę o aktywności glikozylazy. Ponadto, może wchodzić w interakcje z białkami z rodziny AID/APOBEC i prowadzić do powstania w DNA niezmetylowanych cytozyn poprzez usuwanie błędnie połączonych par T:G i 5-hmU:G [Hashimoto i wsp. 2012a, Grin i Ishchenko 2016].

Białka TET oprócz tego, że katalizują reakcję hydroksylacji 5-mC to również mogą oddziaływać z szeregiem białek biorących udział w procesie naprawy DNA przez wycinanie zasad. Do białek tych należą m.in. opisane powyżej TDG i MBD4, ale również NEIL1, NEIL2, NEIL3 (ang. nei endonuclease VIII-like), Co więcej, wszystkie trzy białka TET wchodzi w interakcje z polimerazą poli-ADP-rybozy (PARP1, ang. poly (ADP-ribose) polymerase 1), która rozpoznaje pęknięcia jednoniciowe i modyfikuje czynniki uczestniczące w naprawie przez poly-ADP-rybozylację oraz LIG3 (ang. DNA ligase 3) i XRCC1 (ang. X-ray repair cross-complementing protein 1), biorące udział w ligacji DNA po insercji cytozyny [Müller i wsp. 2014]. Sugeruje to, że reakcje katalizowane przez białka TET i naprawa DNA przez wycinanie utlenionych pochodnych cytozyny przez system naprawy BER są przeprowadzanymi w sposób skoordynowany w czasie i przestrzeni przez jeden duży kompleks białkowy.



Rysunek 2 Schemat przedstawiający aktywne demetylacje DNA, tworzenie poszczególnych produktów reakcji katalizowanej przez TET

3.2.2 Demetylacja pasywna

O demetylacji pasywnej mówimy wtedy, gdy podczas replikacji nie dochodzi do metylacji przez metlotransferazę DNMT1 (ang. DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1) nowo syntetyzowanej nici. Przyczyną braku metylacji podczas syntezy DNA może być obecność w nici macierzystej 5-hmC, powstającej z udziałem białek TET. DNMT1 charakteryzuje się mniejszym powinowactwem do 5-hmC niż do 5-mC i w związku z tym aktywność tej metylotransferazy jest hamowana i w konsekwencji w nici potomnej pojawiają się cytozyny niemodyfikowane. W przypadku dużego stężenia 5-hmC w DNA ulegającym replikacji oraz braku aktywności metylotransferaz odpowiedzialnych za metylację *de novo* (DNMT3a, -3b) dochodzi do biernej demetylacji DNA [Goll i Bestor 2005, Jeltsch 2006, Hashimoto i wsp. 2012b]. Istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu DNMT1 odgrywa białko UHRF1 (ang. ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1), które wspomaga wiązanie DNMT1 do hemimetylowanych widełek replikacyjnych. Białko to, podobnie jak DNMT1, charakteryzuje się ponad dziesięciokrotnie mniejszą zdolnością do wiązania hemihydroksymetylowanych nici DNA [Bostick i wsp. 2007, Frauer i wsp. 2011].

3.3. Wpływ interakcji białek TET z innymi białkami na modyfikacje epigenetyczne

Wiele doniesień literaturowych wskazuje na istotny udział białek TET w regulacji modyfikacji epigenetycznych zarówno na etapie rozwoju, jak i w komórkach organizmów dojrzałych oraz w procesie nowotworzenia przez interakcje z różnymi białkami i niezależnie od ich aktywności enzymatycznej jako dioksygenazy. W większości są to interakcje wpływające na możliwość rekrutowania do histonów swoistych białek wpływających na ich modyfikacje.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Cartron i wsp. z wykorzystaniem metody ligacji zbliżeniowej *in situ* P-LISA (proximity ligation assay) pozwoliły na identyfikację szeregu białek wchodzących w interakcje z TET1. Do białek tych zaliczamy przede wszystkim HDAC1 (ang. histone deacetylase 1), HDAC6 (ang. histone deacetylase 6), HDAC7 (ang. histone deacetylase 7), LSD1 (ang. lysine-specific Demethylase 1), EZH2 (ang. enhancer of zeste homolog 2), MeCP2 (ang. methyl CpG binding protein 2), PCNA (ang. proliferating cell nuclear antygen) i Sin3A (ang. Sin3 transcription regulator family member A), z czego oddziaływania między TET1/mSin3A, TET1/MeCP2 i TET1/EZH2 występowały najczęściej i były najsilniejsze. Ponadto, badacze ci zaobserwowali, że kompleks TET1/PCNA pełni istotne funkcje podczas demetylacji DNA, a jego brak może być przyczyną nieprawidłowego profilu metylacji obserwowanego w nowotworach [Cartron i wsp. 2013]. Tworzenie kompleksów pomiędzy TET1 a LSD1 i EZH2 zostało również zaobserwowane przez innych badaczy. W promotorach genów *ZEB1* (ang. Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1) i *VIM* (ang. Vimentine) kompleks TET1/LSD1/EZH2 odpowiada za utrzymanie trimetylacji reszty lizyny 27 na histonie H3 (H3K27me3 – marker nieaktywnej heterochromatyny) i braku trimetylacji lizyny 4 na histonie H3 (H3K4me3 – marker aktywnej euchromatyny), powodując tym samym zahamowanie ekspresji tych genów. Działanie tego kompleksu jest zupełnie niezależne od powstawania 5-hmC. Brak kompleksu TET1/LSD1/EZH2 skorelowany jest z występowaniem przejścia epithelialno-mezenchymalnego i progresją nowotworu [Su i wsp. 2019]. Zhong i wsp (2015) zaobserwowali, że TET1 wchodzi w interakcje z białkami Sin3A i hMOF (ang. histone H4 lysine K16-specific acetyltransferase). Kompleks TET1/Sin3A/hMOF odpowiada za utrzymanie acetylacji lizyny 16 na histonie H4 (H4K16ac – marker aktywnej euchromatyny). Badacze odnotowali występowanie tego kompleksu w regionach kodujących geny naprawy DNA. Zmniejszenie ekspresji TET1 powodowało zmniejszenie występowania hMOF związanego z DNA, a zwiększało poziom SIRT1 (ang. Sirtuin 1).

SIRT1 , będąca deacetylazą zależną od NAD (ang. Nicotinamide adenine dinucleotide), powodowało znaczący spadek poziomu acetylacji H4K16 i zmniejszenie ekspresji genów kodujących enzymy naprawy DNA [Zhong i wsp. 2015].

W mysich komórkach embrionalnych mESC (ang. mouse embryonic stem cells) Tet1 uczestniczy w wyciszaniu ekspresji niektórych genów przez ułatwianie rekrutacji kompleksu represyjnego Polycomb 2 (PRC2, ang. Polycomb repressive complex 2) do bogatych w pary CpG promotorów tych genów. Mimo, iż nie brak jest bezpośredniej interakcji między Tet1 i głównym składnikiem kompleksu, metylotransferazą histonową EZH2, to wyciszenie ekspresji *Tet1* zakłóca wiązanie EZH2 do miejsc docelowych PRC2 [Wu i wsp. 2011].

Jednym z lepiej opisanych białek pod kątem interakcji z białkami TET jest O-GlcNAc transferaza (OGT, ang. O-GlcNAc transferase) [Chen i wsp. 2013, Deplus i wsp. 2013, Ito i wsp. 2014, Shi i wsp. 2013, Vella i wsp. 2013, Zhang i wsp. 2014]. Kolokalizację białek OGT oraz TET2 i TET3 w miejscach bogatych w H3K4-me3 i odpowiadających występowaniu promotorów genów aktywnych transkrypcyjnie wykazano stosując metodę metody immunoprecypitacji chromatyny w połączeniu z jednoczesnym sekwencjonowaniem DNA (ChIP-Seq, ang. chromatin immunoprecipitation sequencing) [Chen i wsp. 2013, Deplus i wsp. 2013, Vella i wsp. 2013]. OGT modyfikuje białka komórkowe przez przyłączenie pojedynczych reszt N-acetyloglukozaminy wiązaniem O-glikozydowym do reszt seryny lub treoniny białka, wpływając tym samym na aktywność, stabilizację i umiejscowienie wielu białek m.in. enzymów metabolicznych, kinaz, fosfataz, czynników transkrypcyjnych. Dokładniejszy opis białka OGT i O-GlcNAcytacji znajduje się w kolejnych rozdziałach pracy [Ozcan i wsp. 2010, Hart i wsp. 2011]. OGT może również modyfikować histony H2A, H2B, H3 i H4 przez co wpływa na transkrypcję genów [Sakabe i wsp. 2010]. Wyniki badań wskazują, że białka TET odgrywają ważną rolę w rekrutacji OGT do chromatyny dzięki czemu może ona modyfikować histony. W mysich komórkach embrionalnych mESC białko Tet2 jest konieczne, aby OGT mogła modyfikować histon H2B na serynie 112 (H2BS112-O-GlcNAc) [Chen i wsp. 2013]. Modyfikacja tej seryny umożliwia kolejną modyfikację, jaką jest ubikwitynylacja lizyna 120 na histonie H2B (H2BK120-Ub). O-GlcNAc transferaza wchodząc w interakcje z TET2 i TET3 modyfikuje czynnik transkrypcyjny HCF1 (ang. host cell factor 1) i przyczynia się do stabilizacji kompleksu Set1/COMPASS, zawierającego metylotransferazę MLL (ang. mixed lineage leukemia), który łączy się z H2BK120-Ub i odpowiada za trimetylację H3K4 – aktywacja

transkrypcji przez rozluźnienie chromatyny [Fujiki i wsp. 2011, Delatte i Fuks 2013, Deplus i wsp. 2013].

Jiang i wsp. (2015) zaobserwowali, że u chorych na ataksję-teleangiectazję (AT, ang. Ataxia telangiectasia) obserwuje się spadek poziomu 5-hmC i zaburzenia w systemie naprawy DNA. Prowadząc badania z wykorzystaniem mysich komórek Purkiniego zauważyli, że TET1 (ale nie TET2 i TET3) jest ważnym celem dla kinazy ATM (ang. Ataxia telangiectasia mutated). Fosforylacja TET1 przez ATM wpływa na aktywność katalityczną tej dioksygenazy i powoduje wzrost poziomu 5-hmC, co jest istotnym czynnikiem w procesie utrzymania prawidłowego działania systemów naprawy DNA. TET1 ulega fosforylacji głównie na serynie 116 (Ser116), ale występują również miejsca alternatywne tj. seryna 262 (Ser262) i seryna 546 (Ser546). Dowodem na to jest fakt, że dopiero po zablokowaniu wszystkich 3 miejsc sygnał fosforylacji przestawał być wykrywalny [Jiang i wsp. 2015].

U myszy zaobserwowano, że kinaza białkowa AMP fosforyluje serynę 97 (Ser97) białka TET2, a modyfikacja ta odgrywa ważną rolę w procesie miogenezy. Fosforylacja Ser97 stabilizuje TET2 najprawdopodobniej poprzez wiązanie się tej dioksygenazy z białkiem 14-3-3 β . Zauważono, że zmniejszenie ekspresji AMPK prowadziło do spadku poziomu 5-hmC i korelowało ze spadkiem poziomu ekspresji genu *Pax7*, czynnika transkrypcyjnego, odgrywającego ważną rolę w czasie miogenezy [Zhang i wsp. 2019]. Podobnie jak w przypadku Ser97, TET2 może również ulegać fosforylacji przez AMPK na serynie 99 (Ser99). W tym przypadku również dochodziło do stabilizacji TET2 przez interakcje z białkiem 14-3-3 β . Mutacje powodujące utratę fosforylacji Ser99 skorelowane były ze wzrostem progresji nowotworów [Wu i wsp. 2018, Chen i wsp. 2019].

Fosforylacja seryny 1310 (Ser1310) i seryny z 1379 (Ser1379) białka TET3 przez cyklinozależną kinazę CDK5 (ang. Cyclin-dependent kinase 5) jest istotna w procesie różnicowania się komórek nerwowych. Ser1310 i Ser1379 znajdują się w domenie katalitycznej TET3, a ich fosforylacja wpływa na aktywność katalityczną TET3. Zaobserwowano, że fosforylacja wspomnianych reszt seryny w TET3 prowadzi do wzrostu poziomu 5-hmC w promotorze genu *BRN2* (ang. Tissue-restricted POU domain transcription factor) co prowadzi do zwiększenia ekspresji tego genu. BRN2 jest czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym ważną rolę w procesie neurogenezy [Rao i wsp. 2019].

TET3 oddziałuje również z kinazą ATR (ang. Ataxia telangiectasia and Rad3 related). Główną resztą ulegającą fosforylacji i wpływającą najmocniej na aktywność TET3 jest

seryna 637 (Ser637). Oprócz Ser637 fosforylacji mogą ulegać również seryna 42 (Ser42) i seryna 1426 (Ser1426), jednakże w tych dwóch przypadkach efekt jaki wywołuje ta modyfikacja nie jest tak silny. Fosforylacja TET3 przez ATR wpływa na wzrost poziomu 5-hmC i aktywację szlaków naprawy uszkodzeń DNA. Oprócz pozytywnego wpływu na aktywność katalityczną, fosforylacja TET3 przez ATR chroni tę dioksygenazę przed degradacją [Jiang i wsp. 2017].

3.4. Białka TET a proces nowotworzenia

Zaburzona ekspresja genów *TET*, jak również zmiana aktywności enzymatycznej białek TET jest obserwowana w przypadku wielu typów nowotworów, zarówno tych związanych z układem krwiotwórczym, jak i w guzach litych. Odkrycie białka TET1, jako fuzyjnego partnera białka MLL (ang. Mixed lineage leukemia) u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML, ang. acute myeloid leukemia), będących nosicielami translokacji t(10;11)(q22;q23), stanowiło pierwszy dowód na udział białek TET w procesie nowotworzenia [Ono i wsp. 2002, Lorschbach i wsp. 2003]. Mutacja ta jest jednak dosyć rzadka, ponieważ występuje tylko w przypadku 0,3% fuzji [Ittel i wsp. 2013]. W genie *TET1* wykryto również mutacje zmiany sensu i mutacje zmiany ramki odczytu w przypadku AML (~1%) oraz w ostrej białaczce limfoblastycznej T-komórkowej (~6%) [De Keersmaecker i wsp. 2013]. U myszy *TET1*^{-/-} oraz *TET1/2*^{-/-} zaobserwowano większe prawdopodobieństwo wystąpienia chłoniaka B-komórkowego. Dodatkowo, używając sekwencjonowania egzomu, przeanalizowano nowotwory charakteryzujące się niską ekspresją *TET1* i zauważono nawracające mutacje w genach już zmienionych w przypadku chłoniaka grudkowego (FL, ang. follicular lymphoma) i chłoniaka rozlanego z dużych komórek B (DLBCL, ang. diffuse large B-cell lymphoma). Obserwacje te potwierdzają rolę TET1 jako supresora nowotworowego w hematopoezie limfatycznej oraz wskazują, że obniżenie ekspresji TET1 może być jednym z przeoczanych mechanizmów w powstawaniu chłoniaków z komórek B [Cimmino i wsp. 2015, Zhao i wsp. 2015].

W przypadku nowotworów układu krwiotwórczego najczęściej obserwuje się mutacje w genie *TET2*. Są to przede wszystkim mikrodelecje, mutacje somatyczne, czy też utrata heterozygotyczności. Zaburzona ekspresja *TET2* wiąże się ze spadkiem globalnego poziomu 5-hmC w tego typu nowotworach, co prowadzi do zaburzeń w profilu metylacji DNA i prowadzi do deregulacji ekspresji różnego rodzaju genów, w tym genów zaangażowanych w progresję nowotworów [Cimmino i wsp. 2011, Huang i Rao 2014, Ko i wsp. 2015]. *TET2* ulega mutacji w ~20% przypadków zespołu mielodysplastycznego (MDS, ang.

myelodysplastic syndrome), ~20% przypadków nowotworów mieloproliferacyjnych (MPN, ang. myeloproliferative neoplasms), ~20% przypadków AML oraz ~45-50% przypadków przewlekłej białaczki mielomonocytovej (CMML, ang. chronic myelomonocytic leukemia). W większości przypadków są to mutacje zmiany sensu [Abdel-Wahab i wsp. 2009, Delhommeau i wsp. 2009, Solary i wsp. 2014]. Mutacje występujące w obrębie domeny DSBH lub w regionie odpowiedzialnym za wiązanie jonów żelaza Fe²⁺ lub 2-OG przyczyniają się do zaburzenia aktywności enzymatycznej TET2, co w konsekwencji prowadzi do spadku globalnego poziomu 5hmC. Zaobserwowano, że lokalne zwiększenie poziomu jonów żelaza lub 2-OG w szpiku kostnym może przywracać zdolność katalityczną TET2 [Ko i wsp. 2010, Laukka i wsp. 2016]. Ponadto, zaobserwowano, że u myszy z wyciszonym genem *TET2* (*TET2*^{-/-}) zwiększa się ryzyko występowania nowotworów układu krwiotwórczego [Moran-Crusio i wsp. 2011, Quivoron i wsp. 2011]. Informacje te wskazują, że TET2 może pełnić rolę supresora nowotworowego [Ko i wsp. 2010, Moran-Crusio i wsp. 2011, Quivoron i wsp. 2011, Laukka i wsp. 2016]. Badania z zastosowaniem metody sekwencjonowania całego genomu wykazały współwystępowanie mutacji w genie *TET2* wraz z mutacjami w genach, których zaburzenia są często związane z występowaniem nowotworów układu krwiotwórczego. Nie do końca jednak wiadomo, czy współistnienie tych mutacji jest ze sobą powiązane, a jeśli tak to na jakich zasadach. Możliwe, że występowanie poszczególnych mutacji może być konsekwencją pojawienia się innych mutacji [Haferlach i wsp. 2014, Palomero i wsp. 2014, Sakata-Yanagimoto i wsp. 2014].

W przeciwieństwie do TET1 i TET2, mutacje w genie kodującym TET3 są słabo scharakteryzowane. Myszy pozbawione ekspresji tej dioksygenazy (*TET3*^{-/-}) charakteryzowały się dużą śmiertelnością, podczas gdy myszy *TET1*^{-/-} i *TET2*^{-/-} w większości przypadków rozwijały się normalnie. Może to świadczyć o tym, że TET3 pełni ważną funkcję w organizmie, a komórki pozbawione tego białka nie są w stanie prawidłowo funkcjonować [Gu i wsp. 2011, Dawlaty i wsp. 2013]. Dodatkowo, u myszy z wyłączonym zarówno TET2 i TET3 (*TET2/3*^{-/-}) obserwowano dużo szybsze powstawanie ostrej białaczki szpikowej, niż u zwierząt z wyciszonym pojedynczym genem TET2. Ponadto, transformacja komórek z podwójnym nokautem związana była z zaburzeniami w systemie naprawy DNA oraz translokacją chromosomów, co sugeruje, że prawidłowa ekspresja *TET2* i *TET3* jest niezbędna do zachowania integralności genomu i zapobiegania leukemogenezie [An i wsp. 2015]. Zhang i wsp. (2020) zaobserwowali, że ekspresja TET3 jest zwiększona w przypadku AML i jest pozytywnie skorelowana z ekspresją genów supresorowych, takich jak *CDKN2B*,

ZIC2 i *miR-196a* oraz negatywnie skorelowana z ekspresją onkogenów *PAX2*, *IL2RA*, *SOX11* i *PAK7*. Badania te wskazują, że TET3 jest potencjalnym wskaźnikiem prognostycznym u pacjentów z AML i może być stosowany w wyborze sposobu leczenia – chemioterapia lub przeszczep szpiku kostnego [Zhang i wsp. 2020]

Zaburzenia w ekspresji genów TET dotyczą również szerokiego spektrum nowotworów niewywodzących się z układu krwiotwórczego. Ze względu na to, że największą zawartością 5-hmC spośród wszystkich tkanek organizmu charakteryzuje się tkanka mózgowa [Wen i Tang 2014], to nie dziwi fakt, iż najwięcej doniesień literaturowych związanych zaburzeniami w poziomie tej modyfikacji odnosi się właśnie do nowotworów mózgu. Analizy immunohistochemiczne glejaków złośliwych wykazały, że niski poziom 5-hmC prowadził do zmniejszenia przeżywalności pacjentów z glejakiem wielopostaciowym. Ponadto, niski poziom 5-hmC był związany z niską ekspresją TET1 i TET3. Złe rokowania u pacjentów z glejakami mogły być również związane z wysoką ekspresją genów zaangażowanych w proces deaminacji i wycinania zasad BER [Orr i wsp. 2012]. Porównując poziom 5-hmC i 5-mC w gwiaździakach w stadium II i III oraz glejakach z poziomem tych modyfikacji DNA w zdrowej tkance mózgowej, naukowcy zaobserwowali znaczące zmniejszenie poziomu 5-hmC w próbkach nowotworowych oraz brak zmian w poziomie 5-mC [Jin i wsp. 2011]. W przypadku większości glejaków wtórnych zaobserwowano występowanie mutacji genów *IDH1/2*. Mutacje te prowadziły do nadprodukcji 2-HG i spadku poziomu 2-OG, a tym samym do obniżenia poziomu 5-hmC z powodu zahamowania aktywności białek TET [Yan i wsp. 2009, Cohen i wsp. 2013]. Utrata 5-hmC jest częstym i niezależnym od mutacji *IDH1* zdarzeniem w glejakach. Co więcej, glejaki charakteryzujące się obniżoną zawartością 5-hmC wykazywały znaczący spadek poziomu białka TET1 w jądrze komórkowym. Z kolei w glejakach z mutacjami *IDH1* obserwowano akumulację TET1 w jądrze [Müller i wsp. 2012]. Cui i wsp. (2016) zidentyfikowali TET3 jako silny supresor nowotworowy współdziałający z receptorem jądrowym TLX w regulacji wzrostu i samoodnawiania komórek macierzystych glejaka (GSC, ang. glioblastoma stem cells). Oddziaływania TET3-TLX mogą stanowić potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu glejaka wielopostaciowego [Cui i wsp. 2016].

Zmiana poziomu 5-hmC i zaburzona ekspresja genów TET jest obserwowana także w przypadku innych typów nowotworów, takich jak nowotwór piersi, żołądka, jelita grubego, wątroby, płuc, stercza, jajnika, trzustki, prostaty, nerki, endometrium, mięśniak gładkokomórkowy czy czerniak [Haffner i wsp. 2011, Jin i wsp. 2011, Lian i wsp. 2012,

Yang i wsp. 2013, Liu i wsp. 2013, Wielscher i wsp. 2013, Navarro i wsp. 2014, Du i wsp. 2015, Ye i wsp. 2016, Chen i wsp. 2017, Ciesielski i wsp. 2017].

Na ekspresję genów *TET* mogą wpływać pośrednio lub bezpośrednio różne mechanizmy związane z nowotworzeniem, takie jak mutacje, czy zmiana metylacji genu, jednakże istotną rolę również tutaj mikroRNA (miRNA).

Istnieje kilka miRNA, które mają wpływ na poziom ekspresji genów *TET*. Wśród miRNA, które bezpośrednio regulują poziom *TET*, są miR-29, miR-26, miR-22, miR-101, miR-105, miR-125 i miR767 [Cheng i wsp. 2013, Fu i wsp. 2013, Song i wsp. 2013b, Zhang i wsp. 2013]. Większość z tych miRNA wpływa na poziom transkryptu wszystkich *TET*, jednak niektóre z nich wykazują preferencyjny wpływ na konkretne transkrypty *TET*. Stwierdzono, że liczba miejsc wiązania wydaje się wpływać na czułość transkryptów *TET* miR-29, ponieważ *TET3* ma najbardziej przewidywalne miejsca i jest najbardziej istotnie regulowanym *TET* przez miR-29 w ludzkich fibroblastach skóry i mięśniach gładkich naczyń komórki.

U pacjentów z ostrą białaczką szpikową (AML) i bez mutacji w genie *TET2*, odnotowano wzrost ekspresji miR-125, miR-101, miR-29, miR-26 i miR-7 czemu towarzyszył spadek poziomu 5-hmC oraz ekspresji wszystkich genów *TET*, a zwłaszcza *TET2* [Cheng i wsp. 2013]. W komórkach czerniaka zauważono podobną zależność. miR-767 obniża ekspresję *TET1* i *TET3* [Loriot i wsp. 2014], a w raku wątrobowokomórkowym miR-29 wpływa negatywnie na ekspresję *TET1* [Lin i wsp. 2014].

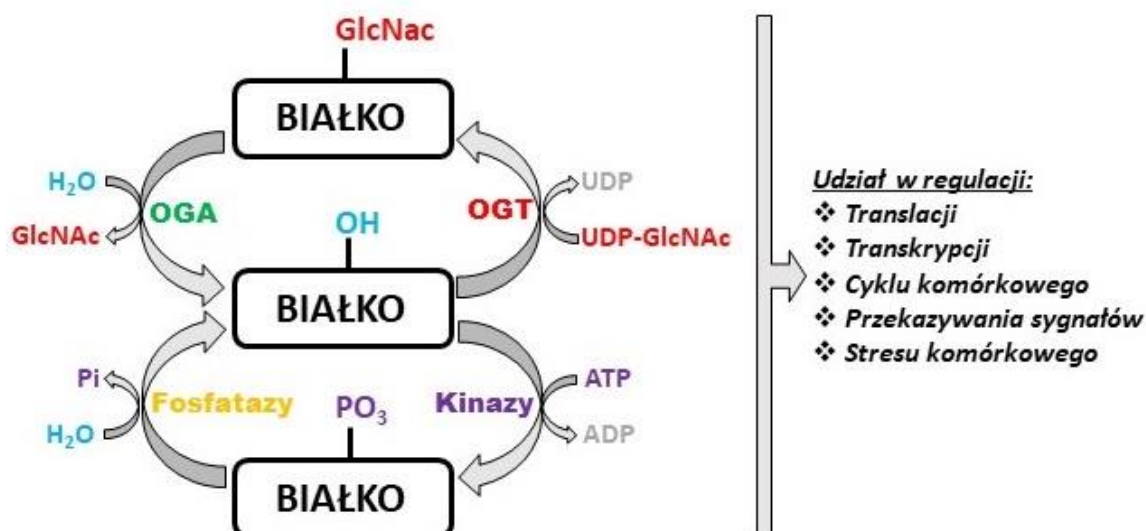
Istnieją również doniesienia, że białka *TET* mogą regulować ekspresję niektórych miRNA. Do takich miRNA należy miR-200, którego funkcją jest hamowanie ekspresji głównych czynników biorących udział w przejściu epithelialno-mezenchymalnym. MiR-200 jest antagonistą proonkogennej miR-22, którego zwiększoną ekspresję obserwuje się w komórkach białaczkowych [Song i wsp. 2013a] i komórkach raka piersi [Song i wsp. 2013b]. Wzrost stężenia miR-22 w komórkach raka piersi powoduje spadek ekspresji *TET*, co prowadzi do wzrostu metylacji regionu promotorowego i obniża ekspresję miR-200. Skutkiem obniżenia ekspresji miR-200 jest zwiększenie zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania [Song i wsp. 2013a, Song i wsp. 2013b].

Dostępne doniesienia literaturowe wskazują, że białka *TET* biorą udział w procesie nowotworzenia w różnorodny sposób, specyficzny dla danego typu nowotworu. Dużą rolę

odgrywa w tym przypadku, oprócz aktywności katalitycznej białek TET, ich zdolność do oddziaływania z innymi białkami oraz mutacje jakim mogą podlegać.

4. Proces O-GlcNAcytacji

O-GlcNAcyłacja jest odwracalną, potranslacyjną modyfikacją białek polegającą na przyłączeniu β -N-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc, ang. N-acetylglucosamine) wiązaniem O-glikozydowym do grupy hydroksylowej seryny i/lub treoniny. Przyłączeniu ulega wówczas wyłącznie cząsteczka monosacharydu, a co za tym idzie nie tworzą się bardziej złożone kompleksy cukrowe. Modyfikacja ta dotyczy zarówno białek jądrowych, cytosolowych, jak i pozakomórkowych. Do białek ulegających O-GlcNAcyłacji zalicza się m.in. białka związane z chromatyną, enzymy glikolityczne, kinazy, czynniki transkrypcyjne, czy też białka cytoszkieletu komórki [Torres i Hart 1984, Comer i wsp. 2000, Hanover i wsp. 2010, Hart i wsp. 2011, Sakaidani i wsp. 2012]. O-GlcNAcyłacja to proces enzymatyczny zachodzący przy udziale O-GlcNAc transferazy (OGT, ang. O-linked N-acetylglucosamine transferase). Natomiast proces odwrotny, czyli usunięcie reszt GlcNAc zachodzi za pośrednictwem β -N-acetylo-D-glukozaminidazy (OGA, ang. O-GlcNAcase) [Vocadlo 2012]. Istnieje wiele białek, których reszty seryny i/lub treoniny mogą ulegać zarówno procesowi O-GlcNAcyłacji, jak i fosforylacji. Interakcje między tymi dwoma modyfikacjami potranslacyjnymi przyczyniają się do regulacji szeregu procesów komórkowych, do których zaliczamy m.in. regulację transkrypcji i translacji, kontrolę cyklu komórkowego, regulację przekazywania sygnałów i modulowanie odpowiedzi na stres komórkowy [Hart i wsp. 2011].



Rysunek 3 Schemat ilustrujący „O-GlcNAc cycling”

4.1. Enzymy zaangażowane w cykl O-GlcNAcylation

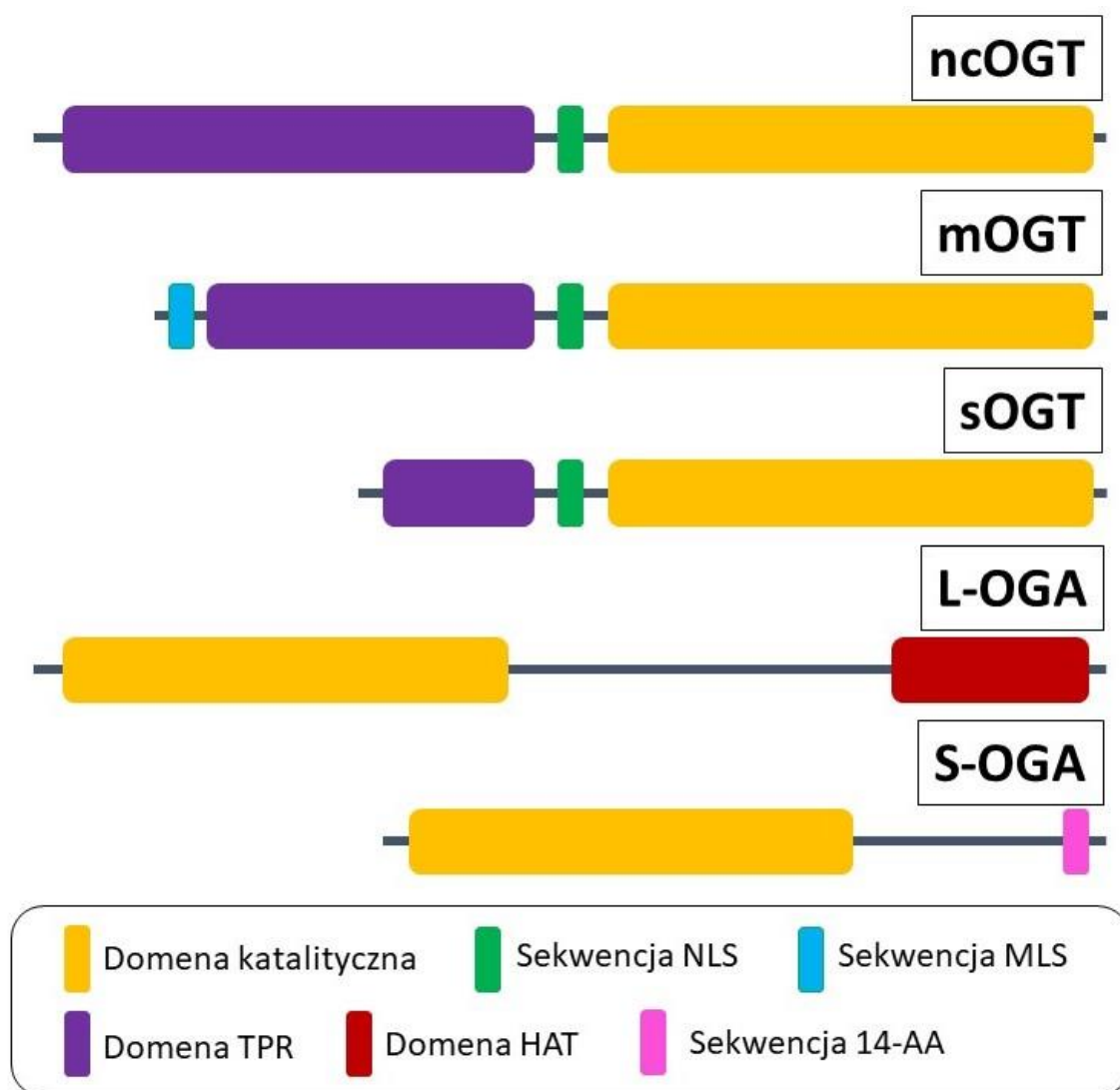
4.1.1 OGT

O-GlcNAc transferaza, a dokładniej β -N-acetyloglukozaminylotransferaza UDP-N-acetyloglukozamina: białko (OGT) (EC 2.4.1) jest enzymem odpowiedzialnym za przyłączenie reszty β -N-acetylo-D-glukozy do grupy hydroksylowej seryny lub treoniny białek wewnątrzkomórkowych. Jest to jedyny poznany enzym o tych właściwościach. O-GlcNAc transferaza kodowana jest przez gen *OGT* zlokalizowany w pobliżu regionu centromerowego chromosomu X (Xq13.1) [Hanover i wsp. 2003]. U ssaków występują wyróżniamy trzy izoformy białka OGT – sOGT (ang. short OGT), mOGT (ang. mitochondrial OGT) i ncOGT (ang. nucleocytoplasmic OGT). Powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA i mają odpowiednio 78, 103 i 110 kDa. [Hurtado-Guerrero i wsp. 2008]. Cechą charakterystyczną wszystkich trzech izoform jest obecność tandemowo ułożonych powtórzeń motywów TPR (ang. tetratricopeptide repeats) na N-końcu białka. TPR zawierają zachowane ewolucyjnie powtórzenia asparaginy i tworzą strukturę superhelisy oraz pełnią bardzo istotną funkcję, mianowicie odpowiadają za interakcje OGT z innymi białkami. Największą liczbą powtórzeń TPR charakteryzuje się ncOGT, natomiast najmniej zawiera sOGT [Iyer i Hart 2003]. Wszystkie 3 izoformy posiadają w swojej centralnej części sekwencje lokalizacji jądrowej. Wyjątek stanowi tutaj mOGT, która oprócz NLS posiada również sekwencję lokalizacji mitochondrialnej (MLS, ang. mitochondrial localization sequence), znajdującą się na N-końcu białka. Na C-końcu białka OGT obecna jest domena katalityczna, która wykazuje dużą homologię do

fosforylasy glikogenu, z której najprawdopodobniej się wywodzi [Wrabl i Grishin 2001, Hurtado-Guerrero i wsp. 2008, Vocadlo 2012].

Substratem dla OGT, a zarazem czynnikiem limitującym aktywność tego enzymu jest UDP-GlcNAc (ang. uridine diphosphate N-acetylglucosamine), będąca końcowym produktem szlaku biosyntezy heksozamin (HBP, ang. hexosamine biosynthesis pathway) [Lazarus i wsp. 2011]. Z kolei czynnikiem, który wpływa na samą aktywność i zdolność do rozpoznawania docelowych białek, które mają ulec O-GlcNAcytacji nie jest do końca poznany. Najprawdopodobniej duży wpływ ma tutaj proces fosforylacji białek docelowych, jak i samego OGT [Hart i wsp. 2011, Vocadlo 2012].

Dwie główne izoformy OGT, czyli ncOGT i mOGT, nie tylko różnią się tylko lokalizacją w komórce, ale również pełnionymi przez nie fizjologicznymi funkcjami. Sacoman i wsp. zaobserwowali, że zmniejszona ekspresja ncOGT związana jest ze zwiększonym oddychaniem komórkowym oraz zwiększoną glikolizą, co wskazuje, że ncOGT pełni głównie rolę w regulacji bioenergetyki komórkowej. Z kolei wyciszenie mOGT skutkuje zależnym od Drp1 (ang. dynamin related protein 1) podziałem, utratą zawartości i zmniejszeniem potencjału błonowego mitochondriów oraz zwiększeniem oddychania komórkowego, prawdopodobnie w wyniku zmniejszenia się liczby mitochondriów w komórce. Wyniki te wskazują, że mOGT odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu stabilności i funkcji mitochondriów [Sacoman i wsp. 2017].



Rysunek 4 Struktura domenowa izoform białek OGT i OGA

4.1.2 OGA

β -N-acetylo-D-glukozaminidaza (OGA) (EC 3.2.1.52) jest enzymem o masie 103 kDa, należącym do rodziny hydrolaz glikozydowych 84 (GH84, ang. glycoside hydrolase 84) [Cantarel i wsp. 2013]. Jest zaangażowana w usuwanie reszt O-GlcNAc z białek cytoplazmatycznych i jądrowych [Gao i wsp. 2001]. Białko OGA kodowane jest przez gen *MGEA5* (ang. meningioma expressed antigen 5) składający się z 16 eksonów, którego locus znajduje się na chromosomie 10 (10q24). Wyróżniamy dwie izoformy β -N-acetylo-D-glukozaminidazy powstające w wyniku alternatywnego splicingu – izoformę długą OGA-L (ang. OGA long form) i izoformę krótką OGA-S (ang. OGA short form), która wykazuje się mniejszą aktywnością niż forma długa [Vocadlo 2012]. W wyniku translacji

wszystkich 16 eksonów genu *MGEA5* powstaje długa izoforma enzymu (OGA-L) składająca się z 916 aminokwasów i występująca głównie w cytoplazmie. Isoforma OGA-S składa się z 677 aminokwasów i powstaje w wyniku braku usunięcia intronu 11, w którym znajduje się alternatywny kodon stop. OGA-S zlokalizowana jest w jądrze komórkowym. [Li i wsp. 2010, Keembiyehetty i wsp. 2011, Vocadlo 2012]. W strukturze OGA wyróżniamy 3 główne domeny. Na N-końcu znajduje się domena katalityczna, która to wykazuje duże podobieństwo do rodziny GH84 i jest odpowiedzialna za odłączanie reszt O-GlcNAc. Na C-końcu zlokalizowana jest domena przypominająca swoją strukturą acetylotransferazy histonowe HAT (ang. histone acetyltransferase), jednakże jest pozbawiona istotnych sekwencji odpowiedzialnych za łączenie się z acetylokoenzymem A. Dokładna rola domeny C-końcowej nie jest jak do tej pory poznana. OGA-S jest pozbawiona tej domeny, natomiast na C-końcu tej izoformy znajduje się fragment składający się z 14 aminokwasów, którego brak jest w OGA-L. W centrum białka znajduje się niewykazująca żadnych funkcji domena trzonowa [Toleman i wsp. 2004, He i wsp. 2014, Rao i wsp. 2013, Li i wsp. 2017]. Aktywność obu izoform jest w podobny sposób hamowana poprzez inhibitory OGA. Natomiast zauważono, że OGA-L wykazuje mniejszą aktywność enzymatyczną w badaniach *in vitro*. Możliwe, że obecność pewnych czynników komórkowych jest niezbędna dla prawidłowego działania tej izoformy [Vocadlo 2012].

4.2. Zaburzenia O-GlcNAcyacji w komórkach nowotworowych

O-GlcNAcyacja bierze udział w wielu podstawowych procesach komórkowych, w tym między innymi w regulacji transkrypcji genów, różnicowaniu komórek macierzystych, czy regulacji aktywności i stabilności białek. Zaburzenia w profilu O-GlcNAcyacji są częstą przyczyną występowania wielu chorób, takich jak cukrzyca, zaburzenia neurologiczne, choroby sercowo-naczyniowe, a także nowotwory [Mi i wsp. 2011, Yang i Qian 2017, Trinca i wsp. 2018, Zhao i wsp. 2018].

W wielu typach raka, takich jak rak piersi [Gu i wsp. 2010, Champattanachai i wsp. 2013], prostaty [Lynch i wsp. 2012, Kamigaito i wsp. 2014], płuc, jelita grubego [Mi i wsp. 2011], przełyku [Qiao i wsp. 2012], endometrium [Krzeslak i wsp. 2012], trzustki [Ma i wsp. 2013b], wątroby [Zhu i wsp. 2012], pęcherza moczowego [Rozanski i wsp. 2012], czy też w przewlekłej białaczce limfatycznej [Shi i wsp. 2010] obserwuje się zwiększoną ekspresję *OGT* oraz podwyższony poziom O-GlcNAcyacji, co sugeruje, że zmiany wewnątrzkomórkowego poziomu *OGT* i O-GlcNAcyacji są ściśle związane

z nowotworzeniem i mogą bezpośrednio lub pośrednio uczestniczyć w progresji i przerzutowaniu nowotworów.

4.2.1 O-GlcNAcyłacja a metabolizm komórek nowotworowych

Podstawowym źródłem energii w komórkach prawidłowych jest fosforyłacja oksydacyjna, natomiast w komórkach nowotworowych, zwiększone zapotrzebowanie na glukozę, dochodzi do glikolizy beztlenowej, w której powstający pirogronian zamiast trafiać do mitochondriów, gdzie ulegałby przekształceniu w acetylo-CoA, jest przekształcany w mleczan. Glikoliza w komórkach nowotworowych zachodzi również w obecności tlenu, a zjawisko to nazywane jest efektem Warburga [López-Lázaro 2008]. Wzmocniona glikoliza jest korzystna dla komórek nowotworowych, ponieważ produkty pośrednie tego procesu zasilają szlaki biosyntezy nukleotydów, aminokwasów i lipidów. Z kolei zwiększona produkcja prekursorów do biosyntezy tych cząsteczek pozwala na szybki wzrost i proliferację komórek nowotworowych [Vander Heiden i wsp. 2009, Jozwiak i wsp. 2014].

O-GlcNAcyłacja odgrywa ważną rolę w zmianie metabolizmu komórek nowotworowych poprzez modyfikację czynników transkrypcyjnych oraz regulację aktywności enzymów metabolicznych [DeBerardinis i wsp. 2018, Ruan i wsp. 2013]. Zwiększone zapotrzebowanie komórek nowotworowych na glukozę i glutaminę prowadzi do pobudzenia szlaku biosyntezy heksozamin, w którym końcowym produktem jest UDP-GlcNAc, będąca substratem dla OGT. Efektem tego jest zwiększona O-GlcNAcyłacja [Ma i wsp. 2013b]. Hiper-O-GlcNAcyłacja może wpływać na zwiększenie aktywności czynników transkrypcyjnych regulujących ekspresję genów kodujących enzymy glikolityczne. O-GlcNAcyłacji mogą podlegać również same enzymy. Najlepiej opisanymi enzymami ulegającymi O-GlcNAcyłacji są fosfofruktokinaza 1 (PFK1, ang. phosphofructokinase 1), izoforma M2 kinazy pirogronianowej (PKM2, ang. pyruvate kinase isoform M2) oraz heksokinaza (HK, ang. hexokinase). O-GlcNAcyłacja PFK1 i PKM2 przyczynia się do zmniejszenia aktywności tych enzymów, natomiast O-GlcNAcyłacja HK do zwiększenia [Kroemer i Pouyssegur 2008, Yi i wsp. 2012, Ward i Thompson 2013, Baldini i wsp. 2016, Wang i wsp. 2017, Singh i wsp. 2020].

PFK1 jest enzymem katalizującym fosforyłację fruktozo-6-fosforanu do fruktozo-1,6-bisfosforanu. Aby możliwa była ta reakcja, PFK1 musi utworzyć oligomery w wyniku działania modulatora jakim jest fruktozo-2,6-bisfosforan. Kluczową rolę w tej allosterycznej aktywacji odgrywa reszta seryny w pozycji 529 (Ser529) łańcucha polipeptydowego.

O-GlcNAcyłacja Ser529 PFK1 w komórkach nowotworowych prowadzi do zahamowania oligomeryzacji PFK1, a w konsekwencji do inhibicji aktywności tego enzymu. Modyfikacja ta jest charakterystyczna tylko dla komórek nowotworowych, ale nie dla komórek prawidłowych o wysokim indeksie proliferacyjnym. Brak aktywnego PFK1 prowadzi to do nagromadzenia się produktów pośrednich glikolizy, które wywierają wpływ na aktywację szlaków bocznych glikolizy. Nadmiernej aktywacji ulega szlak pentozofosforanowy (PPP, ang. pentose phosphate pathway), co prowadzi do zwiększonej biosyntezy nukleotydów. Dodatkowo dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADPH, ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) powstający w PPP wspomaga utrzymanie glutationu w formie zredukowanej, przyczyniając się tym samym do wzrostu ochrony komórki przed stresem oksydacyjnym. Aktywacji ulega również szlak biosyntezy heksozamin, w którym powstaje UDP-GlcNAc będący substratem dla OGT, co prowadzi do hiper-O-GlcNAcyłacji białek w komórkach nowotworowych [Yi i wsp. 2012].

W prawidłowych, dobrze zróżnicowanych komórkach ekspresji ulega głównie izoforma M1 kinazy pirogronianowej PKM1 (ang. pyruvate kinase isoform M1), podczas gdy PKM2 jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych. Obie izoformy kinazy katalizują przemianę fosfoenolopirogronianu do pirogronianu, aczkolwiek PKM2 wykazuje dużo niższą aktywność enzymatyczną w porównaniu do PKM1. Niższa aktywność prowadzi do zmniejszenia wytwarzania pirogronianu w komórkach nowotworowych, jednocześnie sprzyjając pobudzeniu aktywności szlaków bocznych glikolizy dzięki zwiększonej ilości produktów pośrednich. Aktywność PKM2 jest dodatkowo hamowana przez O-GlcNAcyłację reszty treoniny w pozycji 405 (Thr405) i seryny w pozycji 406 (Ser406) [Yi i wsp. 2012, Wang i wsp. 2017, Singh i wsp. 2020].

Odwrotnie niż w przypadku O-GlcNAcyłacji PFK1 i PKM2, przyłączanie reszt O-GlcNAc do heksokinazy wpływa na aktywację tego enzymu. HK katalizuje pierwszy etap glikolizy, zwiększając tym samym ilość substratów dla PPP i szlaku biosyntezy heksozamin (HBP, ang. hexosamine biosynthesis pathway), występujących już i tak w dużych ilościach ze względu na zaburzenie funkcji PFK1 i PKM2 [Baldini i wsp. 2016].

O-GlcNAcyłacja wpływa również na zwiększenie aktywności i stabilności niektórych czynników transkrypcyjnych, biorących udział w regulacji ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w metabolizm komórek. Jednym z takich czynników jest c-Myc. Białko to wpływa na glikolizę poprzez zwiększenie ekspresji białka wiążącego motywy polipirymidynowe (PTB, ang. polypyrimidin tract binding protein) oraz heterogennej

jądrowej nukleoproteiny A1 i A2 (hnRNP A1/A2, ang. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/A2), które sprzyjają zwiększonemu wytwarzaniu PKM2 [David i wsp. 2010]. C-Myc bierze udział w transaktywacji dehydrogenazy A kwasu mlekowego (LDH-2, ang. lactate dehydrogenase-A), zwiększając tym samym produkcję kwasu mlekowego [Shim i wsp. 1997]. Wpływa również na zwiększenie napływu glukozy do wnętrza komórki poprzez zwiększenie ekspresji transportera glukozy GLUT1 (ang. glucose transporter 1) [Osthus i wsp. 2000] oraz pobudzenia metabolizmu glutaminy poprzez zwiększenie ekspresji transporterów dla glutaminy oraz mitochondrialnej glutaminazy [Gao i wsp. 2009]. Innym czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez O-GlcNAcyłację jest NF- κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). O-GlcNAcyłacja może wpływać bezpośrednio na to białko przez modyfikację jego podjednostki p65 lub pośrednio przez modyfikację kinazy IKK β (ang. inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta). Aktywacja NF- κ B wpływa na zwiększenie napływu glukozy do wnętrza komórki przez zwiększenie ekspresji transportera glukozy GLUT3 (ang. glucose transporter 3) [Kawauchi i wsp. 2008, Ma i wsp. 2013b]. Brak podjednostki p65 powoduje, że NF- κ B zmniejsza ekspresję genów mitochondrialnych, co przyczynia się do zmniejszenia fosforylacji oksydacyjnej i przełączenia metabolizmu komórkowego na glikolizę beztlenową [Johnson i wsp. 2011]. Kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym modyfikowanym przez reszty O-GlcNAc jest ChREBP (ang. carbohydrate responsive element-binding protein). O-GlcNAcyłacja powoduje zwiększenie stabilizacji i aktywności tego czynnika. ChREBP przyczynia się do zwiększenia ekspresji genów kodujących enzymy metaboliczne, takie jak wątrobowa kinaza pirogronianowa (L-PK, ang. liver pyruvate kinase), karboksylaza acetylo-CoA (ACC, ang. acetyl-CoA carboxylase) oraz syntaza kwasów tłuszczowych (FAS, ang. fatty acid synthase), odgrywających istotną rolę w biosyntezie nukleotydów i kwasów tłuszczowych w komórkach nowotworowych [Tong i wsp. 2009, Guinez i wsp. 2011].

4.2.2 O-GlcNAcyłacja a przekazywanie sygnału

Zaburzenia szlaków przekazywania sygnałów, związanych z regulacją wzrostu, przeżycia i proliferacji komórek są częstym zjawiskiem w przypadku nowotworów. Do szlaków, których elementy są regulowane przez O-GlcNAcyłację zaliczamy szlak kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, ang. mitogen-activated protein kinases), szlak kinazy AMPK oraz szlak kinazy mTOR (ang. mammalian target of rapamycin kinase) [Ferrer i wsp. 2014].

Szlak MAPK zaangażowany jest w regulację wzrostu, różnicowania, przeżycia i apoptozy komórek. W przypadku komórek nowotworowych szlak MAPK może być także zaangażowany w proces przerzutowania. W wielu typach nowotworów obserwuje się nadmierną aktywację tego szlaku. Aktywowane w skutek zwiększonej O-GlcNAcytacji kinazy z rodziny MAPK fosforylują m.in. białko p38 (ang. p38 mitogen activated protein kinase), Erk1/2 (p44/42, ang. extracellular signalregulated kinases 1/2), MKK3/6 (ang. mitogen-activated protein kinase kinase 3/6) oraz MEKK1/2 (ang. mitogen-activated protein kinase kinase 1/2) wpływając na zwiększenie ich aktywności. Potwierdzeniem udziału OGT w regulacji szlaku MAPK jest fakt, iż zmniejszona ekspresja genu kodującego ten enzym koreluje ze spadkiem aktywności szlaku MAPK. Jest to spowodowane spadkiem fosforylacji kinaz Erk1/2 [Kneass i Marchase 2005, Goldberg i wsp. 2011, Ding i wsp. 2013, Leelahavanichkul i wsp. 2014]. O-GlcNAcyłacja wpływa w znaczący sposób na aktywność szlaku kinazy AMPK. Szlak ten bierze udział w utrzymaniu równowagi energetycznej w komórce. Jego aktywacja jest związana ze wzrostem stosunku AMP (ang. adenosine monophosphate) do ATP (ang. adenosine triphosphate) i skutkuje zwiększeniem katabolizmu i zmniejszeniem anabolizmu w komórce. Wzrost poziomu UDP-GlcNAc w komórce, będącego końcowym produktem szlaku HPB i jednocześnie substratem dla OGT, ma pozytywny wpływ na wzrost aktywności kinazy AMPK. O-GlcNAcyłacji podlegają podjednostki α i γ AMPK, zwiększając znacząco aktywność tej kinazy [Luo i wsp. 2007, Fay i wsp. 2009, Bullen i wsp. 2014]. Trzecim szlakiem, w którego regulację zaangażowany jest proces O-GlcNAcyłacji, jest szlak mTOR. Szlak ten bierze udział w regulowaniu metabolizmu i wzrostu komórki, a jego aktywacja może być spowodowana obecnością czynników wzrostu, insuliny lub substancji odżywczych. O-GlcNAcyłacji mogą podlegać kinazy PI3K/Akt (ang. phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B). Kaskada tych kinaz jest jednym z głównych mechanizmów aktywacyjnych szlaku mTOR. Istotną rolę odgrywa tutaj insulina, która powoduje, że OGT przemieszcza się w okolice błony komórkowej i łączy się z cząsteczkami fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trifosforanu (PIP3, ang. phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate). OGT, w połączeniu z PIP3, ulega fosforylacji na reszcie treoniny w pozycji 308 (Thr308) przez receptor insuliny posiadający aktywność kinazy tyrozynowej. Fosforylacja OGT prowadzi do O-GlcNAcyłacji kinazy Akt na reszcie treoniny w pozycji 308 (Thr308). Modyfikacja ta jest kluczowa do aktywacji Akt. W przypadku braku O-GlcNAcyłacji reszta Thr308 jest fosforylowana przez kinazę PDK1 (ang. phosphoinositide-dependent kinase 1) prowadząc tym samym do zahamowania

aktywności Akt, a tym samym do zmniejszenia przekazywania sygnału w komórce [Yang i wsp. 2008b, Slawson i wsp. 2010].

4.2.3 O-GlcNAcyłacja a progresja nowotworów

Komórki nowotworowe charakteryzują się wysokim tempem metabolizmu, szybkim wzrostem i dużą zdolnością do proliferacji. Spowodowane jest to w dużej mierze przez zmiany w ekspresji szeregu genów. Wiele doniesień wskazuje na znaczny udział O-GlcNAcyłacji w tym procesie. OGT modyfikuje m.in. czynniki transkrypcyjne, onkogeny, czy też białka zaangażowane w przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition) przyczyniając się tym samym do progresji nowotworów [Jang i Kim 2016, Jiang i wsp. 2019, Xu i wsp. 2019].

W wyniku EMT komórki epitelialne nabierają fenotypu mezenchymalnego. Jest to proces charakterystyczny dla nowotworów złośliwych. W trakcie tego procesu dochodzi do zmniejszenia ilości E-kadheryny w błonie komórkowej, będącej markerem epitelialnym [Thiery i wsp. 2009]. E-kadheryna może ulegać O-GlcNAcyłacji. Dochodzi wówczas do zmniejszenia interakcji tego białka z jego partnerami, czyli białkiem p120 oraz β -kateniną. Ponadto, zablokowany zostaje transport E-kadheryny na powierzchnię komórki i tym samym osłabione zostają interakcje komórka-komórka [Padmanaban i wsp. 2019]. Zwiększony poziom OGT i hiper-O-GlcNAcyłacja skorelowane są ze zmniejszoną ekspresją genu *CDH1* kodującego E-kadherynę [Jin i wsp. 2013, Biwi i wsp. 2019]. Aktywność E-kadheryny może być regulowana przez O-GlcNAcyłację również w sposób pośredni. O-GlcNAcyłacja Snail1 (ang. snail family zinc finger 1) na reszcie seryny w pozycji 112 (Ser112) wpływa na stabilizację tego czynnika transkrypcyjnego będącego represorem transkrypcyjnym E-kadheryny. Snail1 obniża ekspresję *CDH* przyczyniając się tym samym do zwiększenia potencjału komórek nowotworowych do migracji i inwazyjności [Park i wsp. 2010].

Istotną rolę w progresji nowotworów odgrywają metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMPs, ang. matrix metalloproteinases). Ich nadekspresja jest obserwowana w przypadku wielu typów nowotworów. Zmniejszony poziom O-GlcNAcyłacji ma negatywny wpływ na ekspresję MMP-2 i MMP-9 [Zhu i wsp. 2012, Qiao i wsp. 2016]. O-GlcNAcyłacja Sirtuiny 1 (SIRT1, ang. NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) wpływa na obniżenie stabilności tej deacetylazy. Spadek poziomu i aktywności SIRT1 wpływa na zwiększenie stabilności i aktywności czynnika transkrypcyjnego FOXM1

(ang. forkhead box M1), który pobudza ekspresję MMP-2 i MMP-9, przyczyniając się tym samym do wzrostu potencjału komórek do migracji i inwazji [Ferrer i wsp. 2017, Han i wsp. 2017].

Jednym z czynników transkrypcyjnych, którego aktywność jest zwiększona w komórkach nowotworowych, jest HIF-1 α (ang. hypoxia-inducible factor-1 α). Jego ekspresja jest indukowana w warunkach niedotlenienia (hipoksji). Czynniki te aktywują ekspresję wielu genów, w tym kodujących m.in. MMPs, E-kadherinę, czy czynniki transkrypcyjne 3 (TCF3, ang. transcription factor 3). Białka te odgrywają kluczową rolę w procesie przerzutowania nowotworów. O-GlcNAcyłacja stabilizuje HIF-1 α , zapobiegając jego degradacji oraz zwiększa jego aktywność [Ferrer i wsp. 2014, Li i wsp. 2015, Balamurugan 2016, Soni i Padwad 2017]. Nadmierna aktywność HIF-1 α w komórkach nowotworowych, spowodowana przez O-GlcNAcyłację, może prowadzić do zwiększenia ekspresji czynnika wzrostu śródbłonnka naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) i tym samym prowadząc do zwiększonej angiogenezy. Proces angiogenezy, czyli tworzenie nowych naczyń krwionośnych z już istniejących, przyczynia się do zaspokojenia potrzeb komórek nowotworowych na tlen i substancje odżywcze, ale także zwiększa zdolność komórek nowotworowych do przerzutowania [Lynch i wsp. 2012, Morfisse i wsp. 2014]. Istotną rolę zarówno w procesie angiogenezy, jak i przerzutowania komórek nowotworowych odgrywa także receptor transbłonowy Notch1 (ang. Notch homolog 1, translocation-associated). O-GlcNAcyłacja powoduje wycięcie i translokację tego białka do jądra komórkowego, gdzie reguluje ono transkrypcję szeregu genów, w tym tych zaangażowanych w progresję nowotworów [Jeon i wsp. 2014, Wieland i wsp. 2017, Jackstadt i wsp. 2019]. Kolejnym białkiem regulowanym przez O-GlcNAcyłację jest NF- κ B. Białko to uczestniczy w odpowiedzi komórki na bodźce stresowe oraz reguluje proliferację limfocytów T i produkcję cytokin. W cytoplazmie występuje w formie nieaktywnej transkrypcyjnie w połączeniu z inhibitorem I κ B (ang. inhibitor of kappa B) [Ali i wsp. 2017, Taniguchi i Karin 2018]. NF- κ B w komórkach nowotworowych może być aktywowany przez O-GlcNAcyłację na dwa różne sposoby. O-GlcNAcyłowana może być kinaza IKK β (ang. I κ B kinase β), która stając się w ten sposób aktywna fosforyluje I κ B powodując jego odłączenie i degradację. Wówczas NF- κ B może ulec translokacji do jądra komórkowego, gdzie działa jako czynnik transkrypcyjny regulujący ekspresję genów zaangażowanych w progresję nowotworów [Yang i wsp. 2008a, Phoomak i wsp. 2016]. O-GlcNAcyłacji może podlegać także sama cząsteczka NF- κ B. Nie wiadomo do końca

w jaki sposób modyfikacja ta wpływa na aktywność NF- κ B, jednakże zaobserwowano, że brak O-GlcNAcylation konkretnych reszt treoniny wpływał na obniżenie zdolności komórek do wzrostu. O-GlcNAcylation NF- κ B może również wywierać pośredni wpływ na wzrost przerzutowania komórek nowotworowych, ponieważ zauważono, że modyfikacja tego białka wpływa na stabilizację Snail1 (ang. snail family zinc finger 1), będącego represorem transkrypcyjnym E-kadheryny [Ma i Hart 2013a]. O-GlcNAcylation może również wpływać na regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego STAT3 (ang. Signal transducer and activator of transcription 3). Jego aktywacja jest uzależniona od fosforylacji określonych reszt aminokwasowych. O-GlcNAcylation umożliwia fosforylację STAT3 na reszcie tyrozyny w pozycji 705 (Tyr705) jednocześnie blokując fosforylację na reszcie seryny w pozycji 727 (Ser727). Taki układ modyfikacji powoduje aktywację STAT3 i jego translokację do jądra komórkowego, gdzie reguluje ekspresję szeregu genów prowadząc do wzrostu angiogenezy i zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania [Wakahara i wsp. 2012, Dubovy i wsp. 2018, Xu i wsp. 2018, Wu i wsp. 2019].

5. Założenia i cel pracy

W powstawaniu i progresji nowotworów istotną rolę odgrywają czynniki epigenetyczne. Zmiany metylacji DNA czy modyfikacji histonów mogą prowadzić do wyciszenia genów zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, apoptozę i naprawę DNA, a także prowadzić do angiogenezy i przerzutowania. Z tego względu poznanie mechanizmów związanych z utrzymaniem prawidłowego wzoru modyfikacji epigenetycznych może mieć ogromne znaczenie dla lepszego zrozumienia procesów transformacji nowotworowej i w konsekwencji przyczynić się do opracowania nowych metod w diagnostyce i terapii nowotworów. Znaczącą rolę w zmianach wzoru metylacji DNA, poprzez udział w demetylacji DNA, odgrywają białka TET. Oprócz udziału w demetylacji DNA, białka TET mogą wpływać na modyfikacje epigenetyczne niezależnie od swojej aktywności enzymatycznej przez interakcje z innymi białkami zaangażowanymi w modyfikacje chromatyny, np. OGT. Informacje dotyczące oddziaływań między białkami TET a OGT są dostępne w literaturze, natomiast brak jest danych dotyczących oddziaływań między białkami TET a OGT w komórkach nowotworowych i wpływie tych oddziaływań na proces progresji nowotworów.

W związku z tym celem rozprawy doktorskiej było określenie związku pomiędzy ekspresją genów TET i OGT a progresją raka endometrium oraz wpływu wzajemnych oddziaływań między TET3 i OGT na regulację ekspresji genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym oraz zdolność komórek raka endometrium do inwazji i przerzutowania.

Badania przeprowadzono wykorzystując próbki tkanki prawidłowej błony śluzowej macicy i tkanki endometrium zmienionych nowotworowo oraz linie komórkowe raka endometrium – HEC-1A i Ishikawa.

Cele szczegółowe przeprowadzonych badań:

- Analiza ekspresji genów *TET1*, *TET2* i *TET3* w próbkach raka endometrium i prawidłowych tkankach błony śluzowej macicy;
- Określenie całkowitego poziomu 5-mC i 5-hmC oraz sprawdzenie korelacji między poziomami 5-mC i 5-hmC a ekspresją genów *TET* w próbkach raka endometrium i prawidłowych tkankach błony śluzowej macicy;

- Określenie wpływu poziomu ekspresji genów TET na rokowanie pacjentek z rakiem endometrium;
- Analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces O-GlcNAcytacji - *OGT* i *OGA*, w próbkach raka endometrium;
- Analiza ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT) - *FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*, w próbkach raka endometrium;
- Określenie wpływu zmienionej ekspresji *OGT* i *TET3* na ekspresję genów zaangażowanych w EMT w liniach komórkowych raka endometrium HEC-1A i Ishikawa;
- Określenie wpływu nadekspresji *TET3* na ilość i komórkową lokalizację *OGT* w liniach komórkowych raka endometrium HEC-1A i Ishikawa;
- Określenie współzależności między *TET3* i *OGT* na ich zdolność wiązania się do chromatyny i modyfikację histonów w liniach komórkowych raka endometrium HEC-1A i Ishikawa;
- Określenie wpływu zwiększonej ekspresji *OGT* i *TET3* na migrację i inwazję komórek raka endometrium HEC-1A i Ishikawa;
- Sprawdzenie korelacji między ekspresją genów zaangażowanych w EMT a *OGT* lub *TET3* w próbkach raka endometrium.

6. Materiał

6.1. Materiał kliniczny

Materiał kliniczny otrzymano dzięki współpracy z prof. dr hab. n. med. Andrzejem Bieńkiewiczem z Oddziału Klinicznego Ginekologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Preparaty zostały pobrane od pacjentek leczonych na Oddziale Klinicznym Ginekologii Onkologicznej Szpitala im. M. Kopernika w Łodzi. Materiał do badań został scharakteryzowany pod względem parametrów kliniczno-patologicznych, a jego dokładna charakterystyka została przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka kliniczno-patologiczna preparatów raka błony śluzowej trzonu macicy

Charakterystyka materiału	Liczba przypadków
Tkanka prawidłowa	51
Tkanka nowotworowa	131
Stopień zaawansowania wg klasyfikacji FIGO	
I	87
II	15
II	25
IV	4
Stopień histologicznej złośliwości	
G1	29
G2	81
G3	21
Stopień naciekania mięśniówki	
<1/2	66
≥1/2	65
Rozrost (Hyperplasia)	
Nie	101
Tak	30
Zajęcie węzłów chłonnych	
Nie	112
Tak	19

6.2. Linie komórkowe

W pracy wykorzystano dwie ludzkie linie komórkowe raka endometrium: HEC-1A i Ishikawa. Zostały one zakupione odpowiednio w American Type Culture Collection (ATCC) oraz w European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) poprzez firmę Sigma-Aldrich.

Charakterystyka badanych linii komórkowych:

- HEC-1A – Linia komórkowa wyizolowana w 1968 r. przez H. Kuramoto i współpracowników. Komórki pochodzą z gruczolakoraka endometrium kobiety w wieku 71 lat. Komórki tworzą umiarkowanie dobrze zróżnicowane gruczolakoraki odpowiadające rakowi endometrium (stopień II). Komórki tworzą typowe gruczolaki brodawkowate;
- Ishikawa – Dobrze zróżnicowana linia komórkowa ludzkiego gruczolakoraka endometrium pochodząca od kobiety w wieku 39 lat.

7. Metody

7.1. Hodowla komórkowa

Komórki hodowano w następujących warunkach: temperatura 37°C, atmosfera wzbogacona w 5% CO₂ oraz 90% wilgotność. Hodowlę komórek prowadzono w medium hodowlanym DMEM:F12 (Lonza, Szwajcaria). Medium dla komórek HEC-1A było uzupełnione w 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS, ang. fetal bovine serum) (Lonza, Szwajcaria), natomiast dla komórek Ishikawa w 5% FBS. DMEM:F12 dla obu linii zawierał dodatek 2 mM L-glutaminy. Medium w butelkach hodowlanych wymieniano co 2 dni. Pasażowanie komórek odbywało się co 4-5 dni w stosunku 1:6 w przypadku linii HEC-1A, natomiast komórki linii Ishikawa pasażowano w stosunku 1:5. Do trypsynizacji wykorzystywano roztwór 0,25% trypsyny z 0,02% EDTA (Lonza, Szwajcaria).

7.2. Wyciszenie ekspresji TET3 i OGT

Ekspresja genów *TET3* i *OGT* została wyciszona przez zastosowanie Silencer® Select siRNA (ID: s47238 dla *TET3*, ID: s16093 dla *OGT*) (Ambion, USA). W kontroli użyto Silencer® Select Negative Control #1 (Ambion, USA) o sekwencji niehomologicznej do genów człowieka. Transfekcję komórek przeprowadzono z użyciem odczynnika Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA), stosując zalecenia producenta. Do pierwszej z dwóch próbek zawierających po 100 µl medium Opti-MEM (Gibco®, USA) ze zredukowaną zawartością surowicy dodano 6 µl Lipofectamine™ 2000. Do drugiej natomiast 3 µl siRNA. Po 5 minutowej inkubacji przenoszono zawartość probówki z siRNA

do probówki z odczynnikami do transfekcji. Mieszano delikatnie i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie zawartość probówki dodawano do dołka z komórkami. Stężenie końcowe siRNA wynosiło 30 nM. Efekt interferencji badano po 48 godzinach od transfekcji.

7.3. Zwiększenie ekspresji TET3 i OGT z wykorzystaniem wektorów plazmidowych

W celu zwiększenia ekspresji *TET3* lub *OGT* transfekcję komórek przeprowadzono z użyciem wektora ekspresyjnego zawierającego gen *TET3* (FH-TET3-pEF, #49446, Addgene) lub gen *OGT* (pCMV6-OGT-myc, #RC224481, OriGene) stosując Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA). Przebieg transfekcji był analogiczny z opisaną wyżej interferencją RNA, z wyjątkiem medium, które pozbawione było surowicy (po 3 godzinach od transfekcji zmienione zostało na zawierające surowicę). Stosunek DNA (μg) plazmidowego do Lipofectamine™ 2000 (μl) wynosił 1:2. Efekt nadekspresji badano po 24 godzinach od transfekcji.

7.4. Zmiana ekspresji TET3 i OGT w różnych wariantach (kotransfekcja)

Kotransfekcja komórek była przeprowadzona przy użyciu Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA), analogicznie do opisanej powyżej procedury stosowanej do interferencji RNA i użycia wektora plazmidowego. Eksperymenty zostały przeprowadzone w następujących wariantach:

- pOGT/pTET3 – komórki z nadekspresją zarówno *OGT*, jak i *TET3*;
- siOGT/siTET3 – komórki z wyciszoną ekspresją zarówno *OGT*, jak i *TET3*;
- pOGT/siTET3 – komórki z nadekspresją *OGT* i wyciszoną ekspresją *TET3*;
- siOGT/pTET3 – komórki z wyciszoną ekspresją *OGT* i nadekspresją *TET3*.

Tak jak w przypadku pojedynczych zmian w ekspresji, tak również i tutaj stężenie końcowe siRNA wynosiło 30 nM, a Stosunek DNA (μg) plazmidowego do Lipofectamine™ 2000 (μl) wynosił 1:2 niezależnie od stosowanego wariantu. Kontrolę w eksperymentach stanowiły komórki traktowane Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA). Efekt kotransfekcji badano po 24 godzinach od transfekcji.

7.5. Otrzymywanie lizatów komórkowych

Z płytki hodowlanej zawierającej badane komórki usuwano medium, dwukrotnie przemywano stosując DPBS (ang. Dulbecco's phosphate-buffered saline). W kolejnym kroku dodawano 0,25% trypsyny z EDTA, inkubowano 5 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji dodano medium inaktywującego działanie trypsyny (w stosunku 2:1 względem zawartości trypsyny). Próbkę wirowano 2 minuty przy przyspieszeniu 700 rpm. Usunięto

supernatant, osad komórkowy przemyto DPBS. Wirowano 2 minuty przy przyspieszeniu 700 rpm. Osad poddawano lizie lub mrożono w -20°C w celu późniejszej analizy.

7.6. Izolowanie RNA z preparatów tkankowych

Izolowanie RNA z preparatów prawidłowych i nowotworowo zmienionych tkanek endometrium oraz z preparatów nowotworowo zmienionych tkanek jajnika przeprowadzono z zastosowaniem proteinazy K oraz TRI Reagentu® (Sigma Aldrich, Germany). Rozdrobnione fragmenty badanych preparatów tkankowych zawieszono w 500 µl buforu do trawienia, zawierającego 10 mM NaCl, 500 mM Tris (pH 7,6), 20 mM EDTA, 1% SDS. Następnie do każdej próbki dodano po 25 µl proteinazy K (20 mg/ml) i inkubowano w temperaturze 50°C przez całą noc. Po trawieniu badanych preparatów tkankowych, do lizatów dodano 500 µl TRI Reagentu® i worteksowano. Po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej dodano 200 µl chloroformu i intensywnie worteksowano. Następnie próbki inkubowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po ponownym intensywnym worteksowaniu, próbki wirowano w temperaturze 4°C przez 15 minut przy 12000 x g. Fazę wodną przeniesiono do nowej próbki typu Eppendorf i dodano 500 µl izopropanolu, a następnie próbki worteksowano. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej próbki wirowano w temperaturze 4°C przez 10 minut przy 12000 x g. Usunięto supernatant, a do osadu RNA dodano 1 ml 75% etanolu. Następnie po zworteksowaniu próbek wirowano je w temperaturze 4°C przez 5 minut przy 10000 x g. Po usunięciu supernatantu, osad RNA suszono w temperaturze pokojowej. Do osadu dodano 20 µl wody pozbawionej aktywności rybonukleaz przy pomocy DEPC (ang. diethylpyrocarbonate) i worteksowano do całkowitego rozpuszczenia osadu RNA. Próbkę RNA przechowywano w temperaturze -20°C.

7.7. Izolowanie RNA z lizatów komórkowych

Izolację RNA z badanych komórek wykonano stosując zestaw EXTRACTME TOTAL RNA firmy DNA Gdańsk. Osad komórek zawieszono w 600 µl buforu RLys z dodatkiem 2-merkapttoetanolu i worteksowano intensywnie przez 60 sekund. Supernatant przeniesiono do minikolumny homogenizacyjnej H, zamieszczonej w próbówce odbierającej. Próbkę wirowano 2 min przy 15000 x g, zachowano przesącz. Do przesączu dodano 600 µl 96% etanolu, mieszając całość przez pipetowanie. Przeniesiono do minikolumny wiążącej B umieszczonej w próbówce odbierającej. Wirowano 1 min przy 15000 x g. Minikolumnę przeniesiono do nowej próbki odbierającej. Dodano do minikolumny 650 µl buforu płuczącego RW1. Wirowano 1 min przy 15000 x g. Następnie dodano 650 µl buforu

płuczającego RW2 i wirowano 30 s przy 15 000 x g. Dodając 500 µl RW2 i wirując 30 s przy 15000 x g wykonano ostateczne płukanie. Wirowano 2 min przy 15000 x g w celu całkowitego usunięcia alkoholu. Suchą minikolumnę ostrożnie wyjęto z probówki odbierającej i umieszczono w jałowej probówce 1,5 ml typu Eppendorf. Naniesiono 20 µl buforu elucyjnego REB centralnie na złożę w minikolumnie. Inkubowano minikolumnę z buforem przez 2 min, wirowano 2 min przy 11000 x g. Usunięto minikolumnę, wyizolowane RNA przechowywano do czasu dalszych analiz w temperaturze -20°C.

7.8. Spektrofotometryczna analiza czystości i stężenia RNA

Czystość otrzymanych preparatów RNA określono metodą spektrofotometryczną poprzez dwukrotny pomiar absorbancji każdej z próbek przy długości fali 260 nm i 280 nm. Przyjętym kryterium czystości RNA była wartość A₂₆₀/A₂₈₀ mieszcząca się w granicach 1,8-2,0. Stężenie RNA w poszczególnych próbkach określono na podstawie wartości absorbancji mierzonej przy długości fali 260 nm korzystając ze wzoru:

$$c \text{ µg/ml} = A_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{rozcieńczenie}$$

gdzie wartość 40 µg/ml oznacza stężenie jednoniciowego RNA odpowiadające absorbancji jednostkowej przy długości drogi optycznej równej 1 cm.

7.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. 2 µg RNA zawieszono w 10 µl wody traktowanej DEPC, a następnie dodano 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl dNTP (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase, 4,2 µl wody traktowanej DEPC. Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) przeprowadzono w termocyklerze GeneAMP 2400 Thermal Cycler (PerkinElmer, USA) według następującego profilu termicznego: 10 minut w temperaturze 25°C, następnie 120 minut w temperaturze 37°C i 5 minut w temperaturze 85°C. Otrzymane cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

7.10. Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR)

Reakcja Real Time PCR, umożliwia określenie liczby kopii mRNA genu w badanej próbce poprzez określenie ilości produktu powstającego w reakcji PCR po amplifikacji cDNA otrzymanego z RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji po zastosowaniu specyficznych dla badanych genów sond wyznakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Przyrost ilości

produktów amplifikowanego genu zmierzony został dzięki zjawisku fluorescencji emitowanej w wyniku degradowania sondy poprzez polimerazę DNA. Na podstawie parametru Ct (ang. copy threshold) wyznaczana jest początkowa ilość matrycy. Jest to teoretyczny numer cyklu, w którym wartość fluorescencji jest wyższa niż przyjęta arbitralnie wartość graniczna.

Analiza ekspresji genów w materiale klinicznym została przeprowadzona przy użyciu TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 1 µl cDNA, 0,5 µl 20x TaqMan® Gene Expression Assays, 5 µl TaqMan® Universal PCR MasterMix (zawiera polimerazę DNA TaqMan®, dNTP, bufor reakcyjny) oraz 3,5 µl wody. Reakcję Real Time PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Niemcy). Profil termiczny reakcji złożony był z denaturacji wstępnej w temperaturze 95°C przez 10 min, a następnie 40 cykli obejmujących inkubację przez 15 sekund w temperaturze 95°C oraz 1 min w temperaturze 60°C. Uzyskane wartości Ct przeliczono na liczbę kopii mRNA badanych genów na 1000 kopii mRNA genu HPRT1 w oparciu o następujące zależności:

$$\Delta Ct = Ct \text{ genu badanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

$$L = 1000 \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

gdzie L to liczba kopii mRNA badanego genu/1000 kopii mRNA genu referencyjnego.

Tabela 2 Nazwy badanych genów oraz numery identyfikacyjne poszczególnych sond TaqMan® wykorzystanych w reakcji Real Time PCR

Nazwa genu	Sonda TaqMan®
<i>FOXA1</i>	Hs04187555_m1
<i>FOXC1</i>	Hs00559473_s1
<i>HPRT1</i>	Hs02800695_m1
<i>MGEA5 (OGA)</i>	Hs00201970_m1
<i>OGT</i>	Hs00269228_m1
<i>TET1</i>	Hs00286756_m1
<i>TET2</i>	Hs00325999_m1
<i>TET3</i>	Hs00379125_m1
<i>TWIST1</i>	Hs01379963_m1
<i>ZEB1</i>	Hs01379963_m1

Analiza ekspresji genów *TET3*, *OGT*, *FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1* w lizatach komórkowych została przeprowadzona przy użyciu zestawu specyficznych par starterów Predesigned KiCqStart Primers (Sigma, USA) i odczynnika 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia)

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło 1 µl cDNA, 0,25 µl startera przedniego (ang. forward primer), 0,25 µl startera wstecznego (ang. reverse primer) – końcowe stężenie obu starterów wynosiło 125 nM, 2 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (zawiera polimerazę DNA HOT FIREPol®, 5x stężony bufor EvaGreen®, 12,5 mM MgCl₂, dNTP, barwnik EvaGreen®) oraz 6,5 µl wody. Reakcję Real Time PCR prowadzono w urządzeniu Mastercycler® ep realplex (Eppendorf, Niemcy). Profil termiczny reakcji obejmował denaturację wstępną w 95°C przez 15 min, po której następowało 40 cykli obejmujących denaturację w 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w 60°C przez 20 sekund oraz elongacji w 72°C przez 20 sek.

Uzyskane wartości Ct początkowo przeliczono na liczbę kopii mRNA badanych genów na 1000 kopii mRNA genu *HPRT1* w oparciu o następujące zależności:

$$\Delta Ct = Ct \text{ genu badanego} - Ct \text{ genu referencyjnego}$$

$$L = 1000 \cdot 2^{-\Delta Ct}$$

gdzie:

L - liczba kopii mRNA badanego genu/1000 kopii mRNA genu referencyjnego, a następnie otrzymane wyniki przeliczono na znormalizowaną krotność zmiany (FC, ang. fold change). Dla kontroli przyjęto wartości równe 1 i w taki sposób zostały przedstawione na wykresach w dalszej części pracy.

W celu obliczenia FC dla badanych genów w próbkach po zmianie ekspresji badanego genu(-ów) korzystano ze wzoru:

$$FC = A/C$$

gdzie:

A – średnia wartość L dla badanego genu w komórkach ze zmienioną ekspresją genu(-ów);

B – średnia wartość L dla badanego genu w komórkach kontrolnych.

Tabela 3 Nazwy badanych genów oraz sekwencje starterów wykorzystanych w reakcji Real Time PCR

Gen	Starter	Sekwencja	Długość fragmentu DNA po amplifikacji [bp]
FOXA1	Forward	GATGGAAGGGCATGAAAC	190
	Reverse	GGCATAGGACATGTTGAAG	
FOXC1	Forward	ATGGCGATTTGATTACAGAC	115
	Reverse	ATTACTGCTTAAGTGTTGCC	
HPRT1	Forward	ATAAGCCAGACTTTGTTGG	179
	Reverse	ATAGGACTCCAGATGTTTCC	
OGT	Forward	GCATTATAAGGAGGCTATTCG	173
	Reverse	TATGAATGGAAGCCAGATTG	
TET3	Forward	ATTGCGTCGAACAAATAGTG	146
	Reverse	GTAGATGACCTTCTCGATCC	
TWIST1	Forward	CTAGATGTTCATTGTTTCCAGAG	136
	Reverse	CCCTGTTTCTTTGAATTTGG	
ZEB1	Forward	AAAGATGATGAATGCGAGTC	162
	Reverse	TCCATTTTCATCATGACCAC	

7.11. Izolacja frakcji cytoplazmatycznej, nukleoplazmatycznej i chromatynowej

Izolacja każdej z frakcji była przeprowadzana na lodzie (4°C) i w obecności inhibitora proteaz – PMSF (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride), zgodnie z protokołem Huang i wsp. [Huang i wsp. 2009]. Zebrane komórki płukano jeden raz w 1X PBS (ang. phosphate-buffered saline). Po zwirowaniu i usunięciu PBS komórki zawieszano w 5 objętościach buforu lizującego (10 mM HEPES (ang. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)) pH 7,4, 10 mM KCl, 0,05% Triton X-100), homogenizowano przy użyciu homogenizatora Dounce’a i inkubowano przez 20 min na lodzie. Po zwirowaniu przy 14000 rpm (4°C) przez 10 min supernatant zawierający białka cytoplazmatyczne przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Osad zawierający jądra komórkowe został przepłukany jednokrotnie w buforze lizującym i zwirowany jak w poprzednim kroku w celu pozbycia się pozostałości frakcji cytoplazmatycznej, a następnie został zawieszony w 5 objętościach buforu o niskiej zawartości soli (10 mM TrisHCl pH 7,4, 0,2 mM MgCl₂, 1% Triton X100) i pozostawiony do inkubacji na 15 min. Po zwirowaniu przy 14000 rpm

(4°C) przez 10 min supernatant zawierający białka nukleoplazmatyczne został przeniesiony do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Osad zawierający chromatynę został zawieszony w 2 objętościach HCl 0,2 N i był inkubowany przez 20 min. Po zwirowaniu przy 14000 rpm (4°C) przez 10 min supernatant zawierający frakcję chromatynową przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml i zneutralizowano go taką samą objętością 1 M TrisHCl pH 8.

7.12. Immunoprecypitacja chromatyny

Z dołków płytki hodowlanej usunięto medium i przepłukano komórki używając DPBS. Następnie, po dodaniu 1% roztwór formaldehydu w DPBS i inkubowano 15 minut w celu wytworzenia się wiązań krzyżowych między białkami a DNA. Reakcję powstawania wiązań krzyżowych przzerwano poprzez dodanie roztworu glicyny do końcowego stężenia 0,125 M/dołek. Po usunięciu mieszaniny dołki dokładnie przepłukano dwa razy przy użyciu DPBS. Następnie dodano bufor lizujący (10 mM HEPES, 85 mM KCL, 0,5% Triton X-100, 1 mM PMSF) i inkubowano przez 5-10 minut. Po inkubacji komórki zostały zdrapane z dołków, a lizaty przeniesione do probówek typu Falcon 15 ml. Po zwirowaniu próbek przy 700 rpm (4°C) przez 2 minuty usunięto supernatant. Osad zawieszono w buforze lizującym o wysokim stężeniu soli (1X DPBS, 1% Triton X-100, 0,5% deoksycholan sodu, 0,1% SDS, 1 mM PMSF) i przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Próbkę poddano sonikacji przez 30 sekund w 4°C przy amplitudzie 30% z wykorzystaniem sonikatora ultradźwiękowego (Vibra Cell™ model VCX-130, USA). Po sonikacji próbki zwirowano przy 10 000 rpm (4°C) przez 10 minut, a supernatant przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. W celu ustalenia ilości przeciwciał potrzebnych do użycia stężenie białka w każdej z próbek doprowadzono do takiego samego poziomu. Z każdej próbki pobrano po 20 µl i przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml (w celu uzyskania tzw. input DNA, czyli DNA przed procesem immunoprecypitacji, stanowiącego kontrolę negatywną w ilościowym PCR, w tym przypadku wynosi 3,33%). Próbkę tę zostały zamrożone w -20°C w celu późniejszego użycia. Do próbek po sonikacji dodano po 20 µl kuleczek agarozowych pokrytych białkiem A (Protein A-Agarose: sc2001, Santa Cruz Biotechnology) i inkubowano na mieszadle rotacyjnym około 30 min w chłodni (4°C) w celu oczyszczenia wstępnego. Po inkubacji próbki zwirowano przy 5 000 rpm (4°C) przez 5 minut, a supernatant przeniesiono do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml. Próbkę podzielono. Do jednej części dodano określoną ilość przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciwko badanemu białku, a do drugiej części dodano królicze przeciwciała

IgG (normal Rabbit IgG # 2729, Cell Signaling Technology®) w celu detekcji niespecyficznych wiązań (tzw. mock IgG - kontrola pozytywna). Próbki inkubowano przez całą noc w 4°C na mieszadle rotacyjnym. Następnego dnia do próbek dodano 50 µl kuleczek agarozowych pokrytych białkiem A i inkubowano kolejne 2 godziny na mieszadle rotacyjnym w 4°C, po czym próbki zwirowano przy 12 000 rpm przez 20 sekund i pozbyto się supernatantu. Osad zawierający kuleczki agarozowe przemyto dwukrotnie buforem lizującym o wysokim stężeniu soli (12 000 rpm przez 20 sekund), a następnie czterokrotnie w buforze płuczającym (100 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM LiCl, 1% Triton X-100, 1% deoksycholan sodu; 12 000 rpm, 20 sekund). Wyjęto z zamrażarki próbki oznaczone jako input DNA. Do wszystkich próbek dodano 200 µl buforu elucyjnego (1% SDS, 0,1 M NaHCO₃) i inkubowano w 67°C przez 2 godziny w celu rozerwania wiązań krzyżowych wytworzonych przez formaldehyd i uwolnienia się DNA. Po zwirowaniu przy 12 000 rpm przez 20 sekund supernatant umieszczono w nowych probówkach typu Eppendorf 1,5 ml i ponownie wstawiono do inkubacji w 67°C tym razem na całą noc. Następnego dnia próbki zwirowano przy 10 000 rpm przez 3 minuty w celu pozbycia się ewentualnych pozostałych kuleczek agarozowych. Z powstałego w ten sposób supernatantu wyizolowano DNA zgodnie z punktem 7.13. Otrzymany DNA wykorzystano w reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR) w celu ocenienia poziomu lokalizacji określonych białek w regionach promotorowych badanych genów.

W wyniku reakcji RT-PCR uzyskano po 3 wyniki dla każdej z prób – dla input, mock IgG i badanego przeciwciała. W pierwszym kroku policzono wartość Ct skorygowanego inputu (Ct(SI)) dla każdej próbki:

$$Ct(SI) = Ct\ input - \log_2 R$$

gdzie:

R – współczynnik rozcieńczenia, dla input 3,33% jest równy 30,3.

Następnie policzono % input dla każdej próby korzystając ze wzoru:

$$\% \text{ input} = 100 * 2^{(Ct(SI) - Ct(IP))}$$

gdzie:

Ct(IP) – wartość Ct dla mock IgG lub badanego przeciwciała

W kolejnym kroku od % input dla badanego genu odjęto wartość % input dla mock IgG i otrzymano pojedynczy wynik dla jednej próbki, uwzględniający wpływ ewentualnego tła:

$$\% \text{ input} = \% \text{ input badanego genu} - \% \text{ input mock IgG}$$

Mając pojedynczy wynik dla każdej próbki, obliczono krotność zmiany (FC, fold change) dla prób traktowanych względem prób kontrolnych:

$$FC = \% \text{ input [T]} / \% \text{ input [K]}$$

gdzie:

T – komórki traktowane

K – komórki kontrolne

Dla lepszego zwizualizowania zmian na wykresach, wyniki FC zostały dodatkowo przeliczone na $\log_2 FC$, czyli logarytm przy podstawie 2 z krotności zmiany.

Tabela 4 Charakterystyka i miano przeciwciał stosowanych podczas immunoprecypitacji chromatyny

Nazwa i klasa przeciwciała	Rodzaj przeciwciała	Zastosowane miano	Producent
Anti-TET3 [C3] C-term (GTX121453) – poliklonalne przeciwciała królika klasy IgG skierowane przeciwko białku TET3	I-rzędowe	1:100	GeneTex
Anti-OGT (#5368) – poliklonalne przeciwciała królika klasy IgG skierowane przeciwko białku OGT	I-rzędowe	1:100	Cell Signaling Technology®
Anti-Histone H2B (glnac S112) (ab130951) – poliklonalne przeciwciała królika klasy IgG skierowane przeciwko histonowi H2B z O-GlcNAcylovaną seryną w pozycji 112	I-rzędowe	1:100	Abcam
Anti-Ubiquityl-Histone H2B (Lys120) (D11) XP® (#5546) – monoklonalne przeciwciała królika klasy IgG skierowane przeciwko histonowi H2B z ubikwitynylowaną lizyną w pozycji 120	I-rzędowe	1:200	Cell Signaling Technology®
Anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) #9751 – monoklonalne przeciwciała królika klasy IgG	I-rzędowe	1:50	Cell Signaling Technology®

skierowane przeciwko histonowi H3 z trimetylowaną lizyną w pozycji 4			
Anti-Normal Rabbit IgG (#2729) – przeciwciało królika klasy IgG, które nie jest skierowane przeciwko jakemukolwiek znanemu antygenowi (wykorzystywane jako kontrola do detekcji niespecyficznych wiązań)	I-rzędowe	1:100	Cell Signaling Technology®

7.13. Izolacja DNA z próbek po immunoprecypitacji chromatyny

W celu izolacji DNA supernatanty otrzymane w ostatnim etapie immunoprecypitacji chromatyny zostały zawieszone w 200 µl mieszaniny zawierającej fenol/chloroform.alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1. Próbkę dokładnie wymieszano i następnie zwirowano przy 14 000 rpm przez 20 minut. Supernatant, zawierający DNA (faza wodna), przeniesiono ostrożnie do nowych probówek typu Eppendorf 1,5 ml i dodano do niego 20 µl 5 M octanu amonu oraz 200 µl izopropanolu. Próbkę inkubowano około 1 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbkę zwirowano przy 14 000 rpm przez 20 minut, a supernatant usunięto. Do osadu zawierającego DNA dodano 500 µl 70% etanolu, dokładnie wymieszano i zwirowano przy 14 000 rpm przez 30 sekund (krok ten powtarzano 3 razy). Po ostatnim zwirowaniu supernatant ostrożnie usunięto, a osad wysuszono w temperaturze pokojowej lub w termobloku. Dokładnie wysuszony osad rozpuszczono w 20 µl buforu Tris/EDTA (1M Tris pH 7,5, 0,5 M EDTA). Otrzymany w ten sposób DNA zamrożono i przechowywano w -20°C lub wykorzystano od razu w reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR) w celu oceny poziomu lokalizacji określonych białek w regionach promotorowych badanych genów.

7.14. Western Blotting

7.14.1 Przygotowanie białek do elektroforezy

Próbki lizatów komórkowych mieszano w proporcji 2:1 z 0,9 objętościami buforu o składzie: 250 mM Tris-HCl (pH 6,8) - 8% SDS – 40% glicerol – pironina oraz z 0,1 objętości 2-merkaptoetanolu. Po 15 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej próbki nanoszono na żel.

7.14.2 Elektroforeza

Rozdział elektroforetyczny prowadzono według metody Laemmli [Laemmli 1970] w płytkach 10% żelu poliakrylamidowego (o wymiarach 100 x 100 x 2 mm), zawierającego 0,1% SDS i 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), w obecności 3% żelu zatężającego zawierającego 0,1% SDS i 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) w układzie:

0,1% SDS – 192 mM glicyna – 25 mM Tris (pH 8,3). Rozdział elektroforetyczny w żelu zatężającym przebiegał przy natężeniu prądu 25 mA na płytkę. Po wejściu w żel rozdzielający rozdzielanie elektroforetyczne prowadzono przy natężeniu prądu 35 mA na płytkę w czasie około 2 godzin.

7.14.3 Transfer białek na membranę Immobilonu-P

Rozdzielone w płytkach żelu poliakrylamidowego z SDS białka przenoszono elektroforetycznie na membranę Immobilonu-P (średnica porów 0,45 μ m) według metody Towbin i wsp. (1979). Stosowano bufor o składzie: 20% metanol – 192 mM glicyna – 25 mM Tris (pH 8,3). Transfer prowadzono przez 16 godzin przy napięciu 55 V w temperaturze 4°C.

7.14.4 Barwienie białek po elektrotransferze

Unieruchomione na membranie Immobilonu-P białka barwiono 0,2% roztworem Ponceau S w 3% kwasie octowym przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Nadmiar barwnika odpłukiwano wodą, aż do momentu pojawienia się widocznych pasm białek, co pozwoliło na kontrolę elektrotransferu. Rozdzielone białka ulegały odbarwieniu podczas inkubacji z roztworem odczynnika blokującego.

7.14.5 Immunodetekcja białek metodą chemiluminescencji

Identyfikację immunochemiczną, unieruchomionych na membranie Immobilonu-P białek, prowadzono według schematu:

- 1) blokowanie wolnych miejsc na membranie Immobilonu-P poprzez godziną inkubację w roztworze o składzie: 0,05 M Tris-HCl – 0,15 M NaCl – 0,03% Tween 20, pH 7,5 (TBS-0,03% Tween 20);
- 2) usunięcie nadmiaru odczynnika blokującego przez trzykrotne przemycie membrany roztworem TBS-0,01% Tween 20, zmiany co 10 minut;
- 3) inkubacja z przeciwciałami pierwszorzędowymi (rozcieńczonymi w odpowiednim stosunku roztworem TBS-0,01% Tween 20) podczas 2 godzin w temperaturze pokojowej; charakterystykę przeciwciał pierwszorzędowych podano w Tabeli 2;

- 4) odpłukanie nadmiaru przeciwciał przez trzykrotne przemycie membrany roztworem TBS-0,01% Tween 20, zmiany co 10 minut;
 - 5) inkubacja z przeciwciałami drugorzędowymi, skompleksowanymi z peroksydazą chrzanu (rozcieńczonymi roztworem TBS-0,01% Tween 20 w odpowiednim stosunku) podczas 1 godziny w temperaturze pokojowej; charakterystykę przeciwciał drugorzędowych podano w Tabeli 2;
 - 6) odpłukanie nadmiaru przeciwciał przez sześciokrotne przemycie membrany roztworem TBS-0,01% Tween 20, zmiany co 5 minut;
 - 7) identyfikacja antygeny metodą chemiluminescencji po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej w 10 ml świeżo przygotowanego roztworu o składzie: 100 mM Tris-HCl (pH 8,6) – 0,05% luminol – 0,01% kwas p-kumarowy – 0,03% H₂O₂
 - 8) utrwalenie chemiluminescencji membrany przez zaciemnienie kliszy rentgenograficznej.
- Wszystkie inkubacje przeprowadzono ze stałym mieszaniem na uchylnej wytrząsarce, z wyjątkiem końcowego etapu uwidocznienia antygeny.

Tabela 5 Charakterystyka i miano przeciwciał stosowanych podczas immunodetekcji

Nazwa i klasa przeciwciała	Rodzaj przeciwciała	Zastosowane miano	Producent
anti-DDDDK tag [F-tag-01] (ab18230) – monoklonalne przeciwciała myszy klasy IgG skierowane przeciwko białku fuzyjnemu zawierającego sekwencję DYKDDDDK	I-rzędowe	1:2500	Abcam
anti-lamin A/C (sc-376248) – monoklonalne przeciwciała myszy klasy IgG skierowane przeciwko laminie A/C	I-rzędowe	1:2500	Santa Cruz Biotechnology
anti-OGT (#5368) – poliklonalne przeciwciała królika klasy IgG skierowane przeciwko białku OGT	I-rzędowe	1:2000	Cell Signaling Technology®
anti-Histone H3 ChIP Grade (ab1791) – poliklonalne przeciwciało królika klasy IgG skierowane przeciwko histonowi H3	I-rzędowe	1:2500	Abcam

anti-β-actin (sc-4778) – monoklonalne przeciwciała myszy klasy IgG skierowane przeciwko β-aktynie	I-rzędowe	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-mouse IgG (sc-2005) - poliklonalne przeciwciała kozy skompleksowane z peroksydazą chrzanu skierowane przeciwko immunoglobulinom myszy klasy IgG	II-rzędowe	1:5000	Santa Cruz Biotechnology
goat anti-rabbit IgG (#7074) – poliklonalne przeciwciała kozy skompleksowane z peroksydazą chrzanu skierowane przeciwko immunoglobulinom królika klasy IgG	II-rzędowe	1:5000	Cell Signaling Technology®

7.15. Określenie potencjału komórek do migracji – „Wound healing assay”

Komórki po wysianiu na płytki 12-dołkowe i potraktowaniu były hodowane do momentu otrzymania około 90% konfluencji. Na około 3 - 4 godziny przed wykonaniem testu medium hodowlane było zmieniane na świeże medium bez surowicy, aby zatrzymać tempo wzrostu komórek (zmniejszony będzie wówczas wpływ podziału i wzrostu komórek na zarastanie pustego obszaru po zadrapaniu). Zadrapania były wykonane przy użyciu końcówki do pipety na 200 µl. Po wykonaniu zadrapania dołki były przepłukiwane dwukrotnie medium bez surowicy w celu pozbycia się pływających komórek. Komórki hodowano w medium bez surowicy w przeciągu trwania całego eksperymentu. Zadrapania były obserwowane pod mikroskopem optycznym i fotografowane przy użyciu aparatu fotograficznego kompatybilnego z mikroskopem. Pierwsze zdjęcie zrobiono od razu po wykonaniu zadrapań (0h). Kolejne zdjęcia zrobiono po 24 godzinach (24h) i po 48 godzinach (48h). Przed każdym wykonywaniem zdjęć medium było zmieniane na świeże.

7.16. Określenie potencjału komórek do migracji i inwazyjności – „Transwell assay”

Zarówno określenie potencjału komórek do migracji i inwazyjności były wykonywane przy użyciu specjalnych insertów Millicell™ (Merck Millipore) o wielkości porów 8 µm i przeznaczonych do 24-dołkowych płytek hodowlanych. Komórki transfekowano dzień przed wysianiem na inserty. Po 24 godzinach od potraktowania komórki trypsynizowano i wysiewano na inserty w liczbie $2,5 \times 10^5$ na insert w medium bez surowicy. W dołkach

płytki hodowlanej pod insertami znajdowało się medium z 20% surowicą pełniące rolę chemoatraktanta. Komórki były hodowane w insertach przez 48 godzin. Jediną różnicą w przypadku sprawdzenia potencjału inwazyjności komórek było pokrycie insertów specjalną żelatynową mieszaniną białek Matrigel® Matrix Basement Membrane (Corning, USA). Inserty zostały pokryte Matrigelem 24 godziny przed eksperymentem i inkubowane w 37°C, aby żel zdążył stężeć.

Po zakończeniu hodowli usuwano medium z insertów i przepłukiwano je dwukrotnie poprzez zanurzenie w zlewce z DPBS. Następnie inserty układano w czystej płytce hodowlanej 12-dółkowej i zalewano 3,7% roztworem formaldehydu w DPBS i inkubowano przez 2 min w temperaturze pokojowej. Roztwór formaldehydu wylewano, a inserty przepłukiwano dwukrotnie poprzez zanurzenie w zlewce z DPBS. W celu permabilizacji komórek inserty zalewano 100% metanolem i inkubowano przez 20 min. W temperaturze pokojowej. Metanol wylewano, a inserty przepłukiwano dwukrotnie poprzez zanurzenie w zlewce z DPBS. Ostatni krok stanowiła inkubacja insertów w barwniku Giemsy przez 15 min w temperaturze pokojowej w celu wybarwienia komórek. Po inkubacji w barwniku komórki przepłukiwano dwukrotnie poprzez zanurzenie w zlewce z DPBS i przy użyciu patyczka higienicznego pozbywano się komórek z wewnętrznej części insertu. Tak przygotowane inserty układano na szkiełku podstawowym, a następnie obserwowano pod mikroskopem optycznym i fotografowano przy użyciu aparatu fotograficznego kompatybilnego z mikroskopem.

7.17. Analiza statystyczna

Analizę istotności różnic w poziomie ekspresji genów w preparatach klinicznych raka endometrium przeprowadzono przy użyciu nieparametrycznych testów: testu U Manna-Whitneya lub testu Kruskala-Wallisa (wraz z testem post-hoc Dunna) w zależności od liczby badanych grup. Wartość $p < 0,05$ przyjęto jako statystycznie istotną.

W przypadku eksperymentów przeprowadzanych z wykorzystaniem linii komórkowych wykorzystano test t-Studenta dla prób niezależnych celem porównania grup. Wartość $p < 0,05$ przyjęto jako statystycznie istotną.

8. Omówienie wyników badań prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Wyniki badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej zostały w większości zamieszczone w dwóch opublikowanych artykułach eksperymentalnych (**Załączniki 1-3**) Wyniki badań, które nie zostały opublikowane, ale zostały omówione w niniejszej pracy znajdują się w **Załączniku 4**. Poniżej znajdują się dane bibliograficzne publikacji omawianych w ramach rozprawy doktorskiej. Kopie publikacji znajdują się w rozdziale Załączniki. Zawarte w dalszych podrozdziałach zawierających wyniki i w rozdziale Dyskusja odnośniki do rysunków lub tabel dotyczą omawianych publikacji i załączników.

❖ Publikacja 1 (Załącznik 1):

Ciesielski, P., Józwiak, P., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Cwonda, Ł., Szczepaniec, S., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., & Krześlak, A. (2017). **Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers**. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695017>

IF = 3,73; punkty MNiSW = 100

❖ Publikacja 2 (Załącznik 2 + Załącznik 3 zawierający Supplementary data):

Ciesielski, P., Józwiak, P., Forma, E., & Krześlak, A. (2021). **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer**. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>

IF = 6,208; punkty MNiSW = 140

❖ Wyniki badań, które nie zostały zamieszczone w publikacjach (Załącznik 4)

8.1. Ekspresja TET1, TET2 i TET3 w raku endometrium

Poziomy ekspresji genów TET1, TET2 i TET3 w próbkach raka endometrium i prawidłowych tkankach błony śluzowej macicy oceniano za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym i skorelowano z danymi klinicznymi i patomorfologicznymi (Załącznik 1, Figure 1). Analiza wykazała, że średnie ekspresje mRNA TET1 i TET2 były znacznie niższe w próbkach raka niż w próbkach prawidłowych tkanek. W guzach bardziej zaawansowanych, sklasyfikowanych jako stadium III i IV, ekspresja TET1 i TET2 była niższa niż w guzach mniej zaawansowanych, co odpowiadało pierwszemu i drugiemu stadium według klasyfikacji FIGO (Załącznik 1, Figure 1a). Nie było znaczących różnic ($p > 0,05$) w ekspresji TET1 i TET2 między guzami o różnym stopniu złośliwości (Załącznik 1, Figure 1b). Jednakże ekspresje TET1 i TET2 były niższe w guzach, które wykazywały zdolność do przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych w porównaniu z rakami bez przerzutów (Załącznik 1, Figure 1). W przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla TET1 i TET2, względna ekspresja TET3 była wyższa w próbkach raka w porównaniu z tkankami prawidłowymi. Nie było istotnych różnic ($p > 0,05$) w ekspresji TET3 między guzami na różnych etapach rozwoju zgodnie z klasyfikacją FIGO, ale ekspresja TET3 wykazywała tendencję do wzrostu wraz ze wzrostem stopnia histologicznej złośliwości guza (Załącznik 1, Figure 1a i 1b). Analiza nie wykazała istotnych różnic ($p > 0,05$) w ekspresji wszystkich trzech genów TET pomiędzy próbkami, w których naciek nie przekraczał połowy grubości mięśniówki ($< 1/2$), a tymi, w których naciek obejmował ponad połowę grubości mięśni ($\geq 1/2$). Stwierdzono statystycznie istotny spadek ekspresji TET1 w próbkach guzów charakteryzujących się współwystępowaniem hiperplazji w porównaniu z tymi, w których nie stwierdzono nadmiernego wzrostu ($p < 0,05$).

8.2. Korelacja między poziomami 5-mC i 5-hmC a ekspresją TET

Próbki raka endometrium wykazywały nieznacznie podwyższony poziom 5-mC i obniżony poziom 5-hmC w porównaniu z próbkami kontrolnymi. Jednak zarówno poziomy 5-mC, jak i 5-hmC nie wykazały istotnego związku z parametrami kliniczno-patologicznymi, takimi jak stadium nowotworu, stopień histologicznej złośliwości i przerzuty do węzłów chłonnych (Załącznik 4, Figure D1 i Figure D2). Procent 5-hmC w całym DNA (5-hmC%) był skorelowany ze względną ekspresją TET1, TET2 i TET3 w tej samej próbce. Zaobserwowano dodatnią korelację między 5-hmC% a względną ekspresją TET1 ($r = 0,3755$) i TET2 ($r = 0,3184$), ale nie zaobserwowano korelacji w przypadku TET3

(Załącznik 1, Figure 2). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej korelacji między ekspresją genów *TET* a poziomem metylacji DNA (Załącznik 4, Figure D3).

8.3. Ekspresja *TET1* a rokowanie pacjentek z rakiem endometrium

66 pacjentek z rakiem endometrium, które przeszły operację przed marcem 2011 r., podzielono na podgrupy o wysokiej i niskiej ekspresji *TET1*, *TET2* lub *TET3*, stosując ich medianę wartości ekspresji jako punkt odcięcia. Analiza przeżycia Kaplana-Meiera została wykorzystana do oszacowania predykcyjnego wpływu ekspresji *TET1*, *TET2* i *TET3* na całkowite przeżycie. Różnice przeżycia całkowitego w przypadku *TET2* i *TET3* nie były istotne statystycznie. Analiza Kaplana-Meiera wykazała, że pacjentki w grupie z niską ekspresją *TET1* miały istotnie krótsze całkowite przeżycie niż w grupie z wysoką *TET1* (przeżycie 5-letnie, test log-rank, $p < 0,04$) (Załącznik 1, Figure 3). Aby ocenić, czy ekspresja *TET1* stanowi niezależny wskaźnik prognostyczny w raku endometrium, wpływ każdej zmiennej na przeżycie określono za pomocą analizy regresji Coxa. Analizy jednoczynnikowe ujawniły, że ekspresja *TET1*, stopień zaawansowania FIGO, stopień histologicznej złośliwości, wielkość guza i stan węzłów chłonnych były istotnie związane z całkowitym przeżyciem (Załącznik 1, Tabela 2). Zmienne, które istotnie korelowały z przeżyciem w analizie jednoczynnikowej, zostały dalej ocenione za pomocą analizy wielowymiarowej. Wyniki analizy wieloczynnikowej potwierdziły, że ekspresja *TET1* była niezależnym czynnikiem prognostycznym przeżycia całkowitego z rakiem endometrium (współczynnik ryzyka: 0,509, 95% przedział ufności (95% CI) = 0,127–0,779, $p = 0,038$) (Załącznik 1, Tabela 2).

8.4. Ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w proces O-GlcNAcytacji (OGT i OGA) w raku endometrium

Poziomy ekspresji genów *OGT* i *OGA* (*MGEA5*) w próbkach raka endometrium i prawidłowych tkankach błony śluzowej macicy oceniano za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym i skorelowano z danymi klinicznymi i patomorfologicznymi. Analiza nie wykazała różnic w ekspresji genu *OGT* (Załącznik 4, Figure D4), natomiast odnotowano statystycznie istotny spadek ($p < 0,05$) ekspresji genu *OGA* wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu oraz w przypadku tkanek nowotworowych, w których zostało stwierdzone zajęcie węzłów chłonnych (Załącznik 4, Figure D5).

8.5. Ekspresja genów EMT w raku endometrium

Poziomy ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne EMT (*FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST*, *ZEB1*) w próbkach raka endometrium i prawidłowych tkankach błony śluzowej macicy oceniano za pomocą ilościowej analizy PCR w czasie rzeczywistym i skorelowano z danymi klinicznymi i patomorfologicznymi.

Analiza ekspresji wykazała, że wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu maleje względna ekspresja *ZEB1*. W preparatach określonych jako III+IV stopień zaawansowania nowotworu ekspresja genu *ZEB1* była istotnie niższa ($p < 0,05$) niż w preparatach sklasyfikowanych jako I stopień zaawansowania nowotworu (Załącznik 3, Figure S4). Ekspresja *ZEB1* była także niższa w przypadku nowotworów, w których zostało stwierdzone zajęcie węzłów chłonnych (Załącznik 3, Figure S4).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w ekspresji genów *FOXA1* (Załącznik 4, Figure D6), *FOXC1* (Załącznik 3, Figure S2) i *TWIST1* (Załącznik 3, Figure S3). Można jednak zauważyć pewną tendencję do obniżonej ekspresji genów *FOXA1* i *FOXC1* w przypadku bardziej zaawansowanych nowotworów (Załącznik 3, Figure S2; Załącznik 4, Figure D6).

8.6. Wpływ OGT i TET3 na ekspresję genów zaangażowanych w EMT

Przeanalizowano wpływ zmian ilości OGT i TET3 na ekspresję genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne (*FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST*, *ZEB1*) w komórkach raka endometrium. Ekspresję *TET3* i *OGT* zmieniono przez traktowanie komórek HEC-1A i Ishikawa wektorami plazmidowymi lub siRNA (Załącznik 2, Figure 1a-d). Ekspresję analizowano w komórkach z niezmienioną ekspresją *OGT* i *TET3* (kontrola), komórkach z nadekspresją *TET3* (pTET3), komórkach z nadekspresją *OGT* (pOGT) i komórkach z nadekspresją zarówno *OGT*, jak i *TET3* (pTET3/pOGT) oraz komórkach kotransfekowanych wektorem plazmidowym i siRNA (pOGT i siTET3).

Zmiany w ekspresji *TET3* i *OGT* wpłynęły na ekspresję *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*, ale nie wpłynęły znacząco na ekspresję *FOXA1*. Nadekspresja *TET3* i *OGT* spowodowała spadek ekspresji *FOXC1* w komórkach *HEC1A* i wzrost ekspresji tego genu w komórkach Ishikawa. Wydaje się, że *TET3* i *OGT* mają odwrotny wpływ na ekspresję *TWIST1* zarówno w komórkach *HEC1A*, jak i Ishikawa, tj. *TET3* powoduje zmniejszoną ekspresję, a *OGT* powoduje zwiększoną ekspresję. Na ekspresję *ZEB1* wpłynęła głównie *OGT*, zwłaszcza w komórkach Ishikawa. Kiedy zarówno *TET3*, jak i *OGT* ulegały nadekspresji, najciekawsze

wyniki zaobserwowano dla *TWIST1*. Wydaje się, że TET3 przeciwdziała wzrostowi ekspresji *TWIST1* spowodowanemu przez OGT. W przypadku ZEB1 jednoczesna nadekspresja *OGT* i *TET3* daje takie same wyniki jak nadekspresja samego *OGT*. Aby potwierdzić wyniki wpływu TET3 i OGT na te geny, przeanalizowano również ekspresję genów w komórkach traktowanych siRNA specyficznymi dla *TET3* lub *OGT* (Załącznik 3, Figure S1). Uzyskane dane z eksperymentów z użyciem siRNA potwierdzają uzyskane wyniki z eksperymentów z nadekspresją.

8.7. Wpływ nadekspresji TET3 na ilość i komórkową lokalizację OGT w komórkach raka endometrium

Ze względu na to, że zgodnie z danymi literaturowymi [Ito i wsp. 2014] wzajemne interakcje między TET3 a OGT mogą wpływać na stabilność i lokalizację wewnątrzkomórkową OGT przeanalizowano wpływ deregulacji ekspresji TET3 na ekspresję i lokalizację OGT we frakcji jądrowej w komórkach endometrium. W komórkach HEC-1A i Ishikawa traktowanych siRNA TET3 lub plazmidowym DNA analizowano ekspresję *OGT*.

Poziomy mRNA i białka OGT w komórkach z wyciszoną ekspresją *TET3* i nadekspresją *TET3* nie zmieniły się (Załącznik 2, Figure 2a i 2b). Nadekspresja TET3 również nie wpłynęła na lokalizację OGT. Nie było różnicy w globalnej cytoplazmatycznej i jądrowej ilości OGT między komórkami kontrolnymi a komórkami z nadekspresją *TET3* (Załącznik 2, Figure 2c). Ponadto, komórki kontrolne i komórki traktowane wektorem transkrypcyjnym frakcjonowano w celu uzyskania frakcji chromatyny. Wyniki wykazały, że nadekspresja *TET3* nie wpłynęła na lokalizację OGT we frakcji jądrowej (Załącznik 2, Figure 2d).

8.8. Współzależność między TET3 i OGT na ich zdolność wiązania się do chromatyny i modyfikację histonów

Ponieważ zarówno deregulacja TET3, jak i OGT miała znaczący wpływ na ekspresję *FOXC1*, *TWIST* i *ZEB1*, zbadano zdolność wiązania się białek TET3 i OGT do regionów chromatyny związanych z tymi genami.

Wyniki pokazały, że zarówno TET3, jak i OGT wiązały się z chromatyną w regionach promotorowych genów EMT w komórkach HEC-1A i Ishikawa (Załącznik 2, Figure 3a i 3b). Nadekspresja *TET3* lub *OGT* w obu typach komórek spowodowała zwiększone wiązanie z chromatyną, natomiast zastosowanie siRNA (*TET3* i *OGT*) spowodowało zmniejszenie wiązania z chromatyną w porównaniu z kontrolą. Przeanalizowano wpływ nadekspresji lub zmniejszonej ekspresji *OGT* i *TET3* na ich ilości (*OGT* lub *TET3*)

w chromatynie związanej z *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*. W komórkach HEC-1A nadekspresja *OGT* zmieniła znacząco wiązanie przeciwciała anti-TET3 tylko w przypadku *ZEB1*, ale nadekspresja TET3 zmniejszyła wiązanie przeciwciała anti-OGT z chromatyną w regionach wszystkich trzech genów. Nadekspresja TET3 w komórkach Ishikawa była związana ze zwiększonym wiązaniem przeciwciała anti-OGT z regionem *FOXC1* i *TWIST1*.

Modyfikacje histonów analizowano tylko w komórkach z nadekspresją *OGT* lub TET3 (Załącznik 2, Figure 4). Ogólnie nadekspresja *OGT* powodowała zwiększoną O-GlcNAcyłację histonu H2B i trimetylację lizyny 4 histonu H3 (Załącznik 2, Figure 4a-d). Jedynym wyjątkiem był region *FOXC1*, w którym metylacja była zmniejszona po nadekspresji *OGT*. Nadekspresja TET3 powodowała ogólnie zmniejszoną O-GlcNAcyłację i ubikwitynację histonu H2B oraz metylację histonu H3 w przypadku wszystkich analizowanych genów (Załącznik 2, Figure 4b i 4f). Wyjątkiem była zwiększona O-GlcNAcyłacja, metylacja i ubikwitynacja histonów w regionie *FOXC1* w przypadku komórek Ishikawa, z nadekspresją TET3. Zatem *OGT* i TET3 miały podobny wpływ na metylację H3K4 w komórkach HEC-1A i Ishikawa. Zwiększona metylacja H3K4 była związana ze zwiększoną ekspresją *FOXC1*.

8.9. Wpływ zwiększonej ekspresji *OGT* i TET3 na migrację i inwazję komórek raka endometrium

W celu oceny zdolności migracji i inwazji komórek raka endometrium z nadekspresją *OGT* i TET3 (Załącznik 2, Figure 5) zastosowano odpowiednio test zarastania rysy oraz test transwell Boyden chamber assay.

Interesującym jest, że efekt nadekspresji TET3 i *OGT* w komórkach HEC-1A był odwrotny niż w przypadku komórek Ishikawa. W komórkach HEC-1A nadekspresja TET3 i *OGT* spowodowała zmniejszoną migrację i inwazję. Potencjał migracyjny komórek kontrolnych Ishikawa (niemodyfikowanych) był bardzo mały i nieznacznie wzrastał po nadekspresji *OGT* lub TET3. Wyniki testów w komorze Boydena wykazały, że zarówno migracja, jak i inwazja komórek były znacząco zwiększone po koekspresji *OGT* i TET3.

8.10. Korelacje między ekspresją genów EMT a *OGT* lub TET3 w raku endometrium

W celu zbadania, czy *OGT* i TET3 były związane z ekspresją genów EMT (*TWIST1*, *FOXC1* i *ZEB1*) w raku endometrium, przeanalizowano korelacje między ekspresjami *OGT* lub TET3 a ekspresjami tych wybranych genów EMT w 131 próbkach tkanek raka endometrium przy użyciu ilościowego PCR (Załącznik 2, Figure 6). Geny te zostały wytypowane ze

względu na to, że w przypadku komórek raka endometrium zmieniona ekspresja zarówno *TET3*, jak i *OGT* miała znaczący wpływ na ekspresję właśnie *TWIST1*, *FOXC1* i *ZEB1*. Wyniki wykazały istotną umiarkowaną korelację między ekspresją *OGT* a *TWIST1* ($r = 0,427$) lub *ZEB1* ($r = 0,479$). Wystąpiła również słaba korelacja między *TET3* a *FOXC1* ($r = 0,229$) i *TWIST1* ($r = 0,247$).

9. Dyskusja

Większość dotychczasowych badań dotyczących białek TET skupiała się na ich zdolności do ułatwiania demetylacji DNA poprzez wytwarzanie 5-hmC. Jednakże od niedawna wiadomo, że białka TET mogą również wpływać na modyfikacje chromatyny i ekspresję genów niezależnie od ich aktywności enzymatycznej. Sugeruje się, że poszczególne białka TET poprzez interakcje z innymi białkami, np. OGT, mogą pośrednio zmieniać ekspresję określonych genów, m.in. tych zaangażowanych w przejście epithelialno-mezenchymalne (EMT, ang. epithelial-mesenchymal transition) [Bauer i wsp. 2015, Lian i wsp. 2016]. Przejście epithelialno-mezenchymalne jest kluczowym etapem w rozwoju nowotworów, w wyniku którego komórki epithelialne nabierają fenotypu mezenchymalnego. EMT związane jest ze wzrostem inwazyjności i przerzutowania, co przyczynia się do przemiany guzów łagodnych w nowotwory złośliwe. Podczas EMT komórki nabłonkowe podlegają transformacji, polegającej na zmianie polaryzacji komórek, która prowadzi do zaniku uporządkowania charakterystycznego dla tkanki nabłonkowej oraz zmniejszenia zdolności adhezyjnych komórek [Thiery i wsp. 2009, Lu i Kang 2019, Sadlecki i wsp. 2020]. Na proces EMT mogą mieć wpływ czynniki epigenetyczne, modyfikujące chromatynę zarówno na poziomie DNA, jak i histonów. Czynniki transkrypcyjne takie jak TWIST i ZEB mogą wpływać na EMT poprzez rekrutację do chromatyny różnych kompleksów modyfikujących chromatynę i wpływających na regulację ekspresji genów [Asakura i wsp. 2015, Xie i wsp. 2017]. Innym przykładem są czynniki transkrypcyjne z rodziny FOX (ang. Forkhead transcription factors), które zaangażowane są w regulację proliferacji komórek, apoptozę, angiogenezę, jak również mają wpływ na progresję nowotworów poprzez kontrolowanie ekspresji genów kodujących białka biorące udział w EMT [Elia i wsp. 2017].

Wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem pobranych od pacjentek próbek raka endometrium, podobnie jak w przypadku większości innych nowotworów złośliwych, wykazały obniżoną ekspresję *TET1* i *TET2* w nowotworach w porównaniu z próbkami tkanki prawidłowej. Zaobserwowanie wyższego poziomu ekspresji *TET3* w nowotworach w porównaniu z tkankami kontrolnymi kontrastuje z wynikami większości wcześniejszych badań dotyczących nowotworów złośliwych, w tym również raka endometrium [Roca i wsp. 2016], które wykazywały zwykle niższą ekspresję mRNA wszystkich genów *TET*. Wyjątek stanowił m.in. rozlany wewnętrzny glejak mostu, gdzie ekspresja zarówno *TET1*, jak i *TET3* była zwiększona w porównaniu z tkanką prawidłową, jak również płaskonabłonkowy rak przełyku, w przypadku którego obserwowano wyższą ekspresję *TET3* niż w sparowanej

próbce kontrolnej błony śluzowej przełyku. Ponadto badania wykazały dodatnią korelację poziomu 5-hmC z ekspresją *TET1* i *TET2*, ale nie *TET3*. Wcześniejsze badania ludzkich nowotworów wykazały również, że białka TET nie były w równym stopniu zaangażowane w hydroksylację 5-mC. Na przykład Du i wsp. stwierdzili, że w raku żołądka całkowity poziom 5-hmC były istotnie i dodatnio skorelowany z ekspresją *TET1*, ale nie z *TET2* lub *TET3* [Du i wsp. 2015]. Obniżona ekspresja *TET*, a zwłaszcza *TET2*, wydaje się być kluczowym mechanizmem odpowiedzialnym za obniżony poziom 5-hmC w czerniaku i raku płaskonabłonkowym przełyku. Dokładna funkcja każdego białka TET w regulacji poziomu 5-hmC jest nadal niejasna. Ostatnie badania sugerują, że wszystkie białka TET hydroksylują 5-metylocytozynę, ale tylko *TET2* i *TET3* biorą udział w kaskadzie demetylacji DNA.

Obniżone poziomy 5-hmC stwierdzono w wielu guzach litych, w tym w glejakach, czerniakach, raku piersi, jelita grubego, wątroby, płuc, prostaty i trzustki. Stwierdzono, że niski poziom 5-hmC koreluje z czasem przeżycia całkowitego w przypadku glejaka, czerniaka, raka piersi i wątroby. Wyniki wielu badań sugerują, że obniżony poziom 5-hmC jest związany ze zmniejszoną ekspresją *TET* [Jin i wsp. 2011, Kudo i wsp. 2012, Liu i wsp. 2012, Yang i wsp. 2013].

W mięśniakach gładkokomórkowych macicy, które są łagodnymi guzami mięśni gładkich błony mięśniowej macicy Navarro i wsp. stwierdzili wyższą ekspresję *TET1* i *TET3*, ale nie *TET2*, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w mięśniaku gładkokomórkowym w porównaniu z prawidłową tkanką mięśniówki macicy. Wykazali również, że większa ekspresja *TET1* i *TET3* w mięśniaku gładkokomórkowym była związana ze wzrostem poziomu 5-hmC [Navarro i wsp. 2014]. W raku jajnika zaobserwowano obniżoną ekspresję *TET3*, która to zdaje się pełnić funkcję supresorową w przypadku tego nowotworu biorąc udział w demetylacji genu prekursora miR-30d oraz zablokowaniu indukowanego przez TGF- β 1 przejścia epitelialno-mezenchymalnego [Ye i wsp. 2016]. Zmniejszenie ekspresji *TET3* w tkance nowotworowej w stosunku do tkanki kontrolnej zaobserwowano również w przypadku raka szyjki macicy (stadium III) [Bronowicka-Kłys i wsp. 2017] oraz w raku jelita grubego [Van Damme i wsp. 2016]. Dodatkowo, Misawa i wsp. (2018) zauważyli, że metylacja *TET3* była silnie powiązana ze słabą przeżywalnością chorych na raka jamy ustnej i gardła w stadium T1 i T2 [Misawa i wsp. 2018].

Ponadto, uzyskane wyniki po raz pierwszy sugerują, że obniżona ekspresja mRNA *TET1* koreluje z progresją nowotworu i może służyć jako potencjalny biomarker prognostyczny w raku endometrium. Analiza wykazała, że niższa ekspresja *TET1* w guzach istotnie

przewidywała gorsze całkowite przeżycie. Ze względu na to, że badanie obejmowało stosunkowo niewielką grupę pacjentów, sugeruje się przeprowadzenie badań na dużą skalę, aby potwierdzić uzyskane wyniki.

W ludzkich nowotworach różnorodne mechanizmy mogą zakłócać bezpośrednio lub pośrednio ekspresję *TET*. Związane jest to przede wszystkim z mutacjami *TET*, wpływem regulatorów ekspresji genów *TET* i metylacją regionów DNA genów *TET*. Różnice w poziomach transkryptów genów *TET* mogą zależeć również od różnej ekspresji mikroRNA (miRNA). Wśród miRNA, które bezpośrednio regulują poziomy *TET*, są miR-29, miR-26, miR-22, miR-101, miR-105, miR-125 i miR767 [Cheng i wsp. 2013, Fu i wsp. 2013, Song i wsp. 2013b, Zhang i wsp. 2013]. Większość z tych miRNA wpływa na poziomy transkryptów wszystkich *TET*, aczkolwiek niektóre z nich regulują ekspresję tylko wybranych *TET*. Zhang i wsp. zaobserwowali w ludzkich fibroblastach skóry i komórkach mięśni gładkich naczyń, że miR-29 wykazuje preferencje w kierunku regulowania ekspresji *TET3* ze względu na to, że transkrypt *TET3* posiada największą spośród wszystkich *TET* liczbę sekwencji niepodlegających translacji 3'UTR (ang. 3' untranslated region), do których łączy się miR-29 [Zhang i wsp. 2013]. W liniach komórkowych czerniaka zaobserwowano, że miR-767 może działać jako regulator poziomu 5-hmC w komórce poprzez celowanie w geny *TET*, aczkolwiek wykazano, że miR-767 miał preferencyjny wpływ na regulację *TET1* [Loriot i wsp. 2014].

Uzyskane wyniki badań mogą sugerować, że rola *TET3* w raku endometrium jest inna niż rola *TET1* i *TET2* i może być niezależna od jego aktywności katalitycznej. Trzy białka *TET* mają wysoki procent homologii sekwencji w regionie otaczającym katalityczną domenę C-kończową i mają podobną aktywność enzymatyczną. Jednak charakterystyczne regiony każdego białka z rodziny *TET* sugerują, że każde z nich ma unikalne powinowactwo wiązania z chromatyną lub oddziałuje z różnymi białkami. Zatem możliwe jest, że każdy *TET* może odgrywać określoną rolę w zależności od typu komórek i różnych stadiów rozwoju nowotworu. Chociaż większość badań koncentruje się na enzymatycznych rolach białek z rodziny *TET*, kilka badań wykazało niekatalityczną aktywność tych białek. Na przykład stwierdzono, że *TET1* oddziałuje z czynnikami indukowanymi hipoksją (HIF) i zwiększa ekspresję genów, regulowanych przez hipoksję. *TET1* oddziałuje również z kompleksem korepresora SIN3A, prowadząc do represji transkrypcji wielu genów [Williams i wsp. 2011, Tsai i wsp. 2013, Lian i wsp. 2016]. *TET2* i *TET3* mogą wchodzić w interakcje z transferazą O-GlcNAc (OGT), a te interakcje promują GlcNAcyłację

i zwiększają H3K4me3 przez kompleks SET1/COMPASS [Deplus i wsp. 2013]. Niekatalityczne działanie TET powoduje, że w określonych warunkach mogą one pełnić również funkcję promującą nowotworzenie. W związku z tym sugeruje się, że różne białka TET mogą odgrywać różną rolę w powstawaniu i progresji nowotworów endometrium.

Jednym z bardziej istotnych i intensywnie badanych w ostatnim czasie białek mogących wchodzić w interakcje z białkami TET jest OGT. OGT jest enzymem odpowiadającym za modyfikację białek komórkowych przez przyłączenie pojedynczych reszt N-acetyloglukozaminy wiązaniem O-glikozydowym do reszt seryny lub treoniny białka. Ta dynamiczna modyfikacja wpływa na aktywność, stabilizację i lokalizację szeregu białek m.in. enzymów metabolicznych, kinaz, fosfataz, czynników transkrypcyjnych i wielu innych [Hart i wsp. 2011]. Zwiększenie ekspresji OGT i hiper-OGlcNAcyłacja są cechami charakterystycznymi większości nowotworów [de Queiroz i wsp. 2014]. Badania z zastosowaniem metody immunoprecypitacji chromatyny w połączeniu z równoległym sekwencjonowaniem DNA (ChIP-Seq, *chromatin immunoprecipitation-sequencing*) wykazały kolokalizację TET1, TET2, TET3 i OGT w miejscach bogatych w histon 3 trimetylowany na lizynie 4 (H3K4me3) i odpowiadających występowaniu promotorów aktywnych transkrypcyjnie genów [Chen i wsp. 2013, Deplus i wsp. 2013, Vella i wsp. 2013]. Chociaż białka TET mogą być O-GlcNAcyłowane nie zaobserwowano, aby ta modyfikacja wpływała na ich aktywność katalityczną [Chen i wsp. 2013, Deplus i wsp. 2013, Ito i wsp. 2014]. Interakcje z OGT mogą jednak stabilizować białko TET1 [Shi i wsp. 2013] oraz wpływać na wewnątrzkomórkową lokalizację TET3 [Zhang i wsp. 2014]. Białka TET odgrywają podstawową rolę w rekrutacji OGT do chromatyny dzięki czemu może ona modyfikować histony. Wyniki badań dokonanych przez Ito i wsp. wskazują, że główną rolę w rekrutacji O-GlcNAc transferazy do chromatyny oraz w regulacji jej stabilności odgrywa białko TET3. Ito i wsp. wyciszając ekspresję *TET3* w embrionalnych komórkach nerki HEK 293 zaobserwowali znaczący spadek poziomu białka OGT, mimo iż poziom mRNA dla *OGT* nie ulegał zmianie. Natomiast po nadekspresji *TET3* dochodziło do wzrostu stabilności i poziomu białka OGT oraz zwiększonej rekrutacji OGT do chromatyny [Ito i wsp. 2014]. Z kolei inny zespół badawczy zaobserwował, że w przypadku wyciszonej ekspresji *TET1* i *TET2* nie dochodziło do zmian w poziomie białka OGT [Vella i wsp. 2013].

W celu sprawdzenia, czy interakcja między TET3 a OGT może mieć wpływ na migrację i inwazję komórek raka endometrium poprzez wpływ na ekspresję genów związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym (EMT) przeprowadzono badania

z wykorzystaniem dwóch linii komórkowych raka endometrium (HEC-1A i Ishikawa). Na podstawie badań wstępnych oraz doniesień literaturowych wybrane zostały następujące geny mające związek z regulacją przejścia epitelialno-mezenchymalnego – *FOXC1*, *TWIST1* i *ZEB1*. Rodzina FOX bierze udział w inicjacji i progresji onkogenezy oraz mają negatywny wpływ na oporność na terapie farmakologicznych. *FOXC1* (ang. forkhead box C1) pełni rolę m.in. w onkogenezie raka szyjki macicy wpływając na rozwój, progresję oraz proliferację komórek nowotworowych, poprzez aktywację szlaku PI3K/AKT [Abe i wsp. 2012, Eliań i wsp. 2017].

W literaturze gen *TWIST1*, opisywany jest jako onkogen, odgrywający istotną rolę w proliferacji oraz przerzutowaniu nowotworów *TWIST1* bierze udział w przejściu epitelialno-mezenchymalnym, komórek nowotworowych, hamuje apoptozę i różnicowanie komórek nowotworowych oraz sprzyja angiogenezie oraz wpływa na oporność na leki [Xie i wsp. 2017]. Badania [Kyo i wsp. 2006] wskazują, że ekspresja *TWIST* w komórkach nowotworowych endometrium przyczynia się powstawania komórek o zmienionym fenotypie ze skłonnością do naciekania mięśniówki macicy. Wskazywany jest również wpływ *TWIST* na zmianę ekspresji N-kadheryny, kateniny, wimentyny czy fibronektyny, które przyczyniają się do zmiany fenotypu komórek z nieruchomego (epitelialnego) na ruchliwy (mezenchymalny) w raku endometrium. Analiza zmian ekspresji genu *TWIST1* jest czynnikiem prognostycznym w nowotworze endometrium, m.in. w celu sprawdzenia odpowiedzi na terapię farmakologiczną [Kyo i wsp. 2006].

Dane literaturowe wskazują na związek ekspresji *ZEB1* ze zwiększoną inwazyjnością nowotworów poprzez wzrost markerów mezenchymalnych, np. wimentyny [Singh i wsp. 2008]. Nadekspresja *ZEB1*, została wykryta w nowotworach endometrium i powiązana jest z obniżeniem poziomu E-kadheryny oraz zwiększoną ekspresją markerów mezenchymalnych. W ten sposób *ZEB1* wpływa na metastazę raka endometrium, zmniejszając szanse pacjentów na powrót do zdrowia. Ponadto analiza ekspresji *ZEB1* może pomagać w diagnostyce różnicowej agresywnych raków endometrium [Romero-Pérez i wsp. 2013; Asakura i wsp. 2015].

Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych pokazują, że zarówno TET3, jak i OGT wpływają na migrację komórek i inwazję komórek raka endometrium, jednak nieoczekiwanie ich efekty są różne w komórkach HEC-1A i Ishikawa.

Komórki Ishikawa charakteryzują się dobrym zróżnicowaniem, a ich potencjał migracyjny jest niski. Nadekspresja *TET3* i *OGT* spowodowała wzrost potencjału migracyjnego komórek Ishikawa, co było szczególnie widoczne, gdy oba białka ulegały zwiększonej ekspresji. Zwiększona ekspresja *TET3* i *OGT* spowodowała znaczny wzrost ekspresji *FOXC1*. Co ciekawe, zwiększona ekspresja *TET3* spowodowała zwiększone wiązanie OGT z chromatyną w regionie genu *FOXC1* oraz wzrost O-GlcNAcytacji histonu H2B i trimetylacji histonu H3 (H3K4). Może to sugerować, że *TET3* odgrywa rolę w kierowaniu OGT do chromatyny w komórkach Ishikawa. Wyniki nie wykazały ogólnego wzbogacenia OGT we frakcji chromatynowej po nadekspresji *TET3*, nie wyklucza to jednak możliwości, że *TET3* bierze udział w kierowaniu OGT do określonych miejsc w chromatynie.

Komórki HEC-1A, w przeciwieństwie do komórek Ishikawa, wykazywały obniżony potencjał migracyjny po nadekspresji *TET3* i *OGT*. Co ciekawe, w tych komórkach ekspresja *FOXC1* była zmniejszona po nadekspresji *TET3* lub *OGT*. Na tym etapie badań nie można jednoznacznie określić przyczyny różnego wpływu *TET* i *OGT* na *FOXC1* w badanych liniach komórkowych. Oba typy komórek reprezentują raka endometrium typu I. Tradycyjnie raka endometrium dzieli się na dwa podtypy o różnych parametrach klinicznych, patologicznych, histologicznych i molekularnych. Raki endometrium typu I stanowią 85% wszystkich raków endometrium i są to głównie niskozróżnicowane, estrogenozależne gruczolakoraki z ekspresją receptorów hormonalnych i morfologią endometrioidalną [Winterhoff i wsp. 2020]. Jednak pomimo wielu podobieństw te dwa typy komórek różnią się pod wieloma względami. Na przykład komórki Ishikawa w przeciwieństwie do HEC-1A nie wykazują ekspresji genu *PTEN*. Z drugiej strony komórki Ishikawa posiadają wszystkie receptory estrogenowe, a komórki HEC-1A nie posiadają ekspresji *ESR1*. Komórki Ishikawa wytwarzają więcej estradiolu z estronu niż komórki HEC-1A [Hevir-Kene i Rižner 2015]. Związek między *ERα* a ekspresją genów *EMT* jest dobrze znany dla raka piersi [Voutsadakis 2014]. Dlatego uważa się, że różne tło molekularne może stanowić powód różnego wpływu *TET3* i *OGT* na *FOXC1*. Konieczne są przyszłe badania, aby zidentyfikować wszystkie czynniki wpływające na interakcje między *TET3* i *OGT* na regulację *FOXC1*. Chociaż wpływ *TET3* i *OGT* na ekspresję *FOXC1* w komórkach HEC-1A i Ishikawa jest przeciwny, wydaje się, że migracja i inwazja komórek endometrium są skorelowane z ekspresją tego czynnika. Kilka badań powiązało aktywność *FOXC1* z agresywnym fenotypem w komórkach nowotworowych, zwłaszcza w raku podstawnokomórkowym piersi i raku wątrobowokomórkowym [Elian i wsp. 2017].

Chociaż badania *FOXC1* w raku endometrium nie są zaawansowane, sugeruje się, że *FOXC1* może być potencjalnym onkogenem również w raku endometrium [Elian i wsp. 2017]. W raku endometrium obniżenie poziomu *FOXC1* przez miRNA – szczególnie miRNA 204 i miRNA 495 – spowodowało zahamowanie wzrostu i migracji komórek nowotworowych [Chung i wsp. 2012, Xu i wsp. 2016]. Wyniki badań wydają się potwierdzać znaczenie *FOXC1* w agresywnym fenotypie komórek raka endometrium. Jednak analiza ekspresji mRNA *FOXC1* w tkankach raka endometrium nie wykazała związku ekspresji *FOXC1* z cechami kliniczno-patologicznymi (Załącznik 3, Figure S2).

Uzyskane wyniki wskazują, że OGT i TET mają odwrotny wpływ na ekspresję *TWIST1* i *ZEB1* oraz modyfikacje histonów, zarówno w komórkach HEC-1A, jak i komórkach Ishikawa. OGT zwiększa O-GlcNAcyłację H4S112 i metylację H3K4 w regionie promotorowym *ZEB1*, co skutkuje zwiększoną ekspresją tego genu. Przeciwnie, nadekspresja *TET3* była związana ze zmniejszoną O-GlcNAcyłacją i metylacją. Nadekspresja *OGT* również znacząco zwiększyła metylację H3K4 i ekspresję *TWIST1*, podczas gdy *TET3* zmniejszył zarówno metylację, jak i ekspresję. Z kolei potencjał migracyjny komórek HEC-1A nie był skorelowany ze zwiększoną ekspresją *ZEB1* lub *TWIST1*. Badania Feng i wsp. wykazały, że *ZEB1* był związany z przerzutami raka endometrium. Ekspresja *ZEB1* była istotnie związana z podtypem, stopniem, inwazją mięśniówki macicy i przerzutami do węzłów chłonnych w raku endometrium [Feng i wsp. 2014]. Shen i wsp. wykazali również istotnie wyższą ekspresję *TWIST1* u pacjentek z rakiem endometrium typu I w porównaniu z prawidłowym endometrium, a nieprawidłowa ekspresja *TWIST1* była istotnie związana z parametrami klinicznymi, co wskazuje na złe rokowanie i krótsze przeżycie pacjentek [Shen i wsp. 2020]. Jednak Sadlecki i wsp. nie znaleźli istotnych powiązań między kliniczno-patologicznymi cechami pacjentek z rakiem endometrium a ekspresją *TWIST1*, *TWIST2*, *ZEB1* [Sadlecki i wsp. 2020]. Uzyskane wyniki w ramach rozprawy również nie wykazały żadnej korelacji między ekspresją *TWIST1* a parametrami kliniczno-patologicznymi, a ekspresja *ZEB1* była jeszcze niższa w bardziej zaawansowanych nowotworach w porównaniu z mniej agresywnymi nowotworami (Załącznik 3, Figure S3 i S4).

Zatem funkcja induktorów EMT w raku endometrium wymaga dalszego wyjaśnienia. Ekspresja i funkcja czynników mających wpływ na EMT mogą się znacznie różnić w zależności od różnych typów nowotworów, a nawet typów komórek, w zależności od kontekstu molekularnego [Lu i Kang 2019]. Na przykład stwierdzono, że *TWIST1* promuje

przerzuty w modelu raka piersi, ale wykazano, że jest zbędny w przypadku przerzutów w modelu raka trzustki. Czasami czynniki mogą mieć nawet przeciwne skutki w różnych nowotworach. *ZEB2* wiąże się z powstawaniem przerzutów w nowotworach jajnika, żołądka i trzustki, ale zmniejsza agresywność czerniaka [Lu i Kang 2019].

Uzyskane wyniki przyczyniły się do poznania złożonego mechanizmu sprzyjającego progresji raka endometrium, jednakże potrzebne są dalsze badania w celu wyjaśnienia znaczenia poszczególnych induktorów EMT w progresji raka endometrium oraz wyjaśnienia znaczenia poszczególnych zmian związanych z TET w początku i progresji raka endometrium.

9.1. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że:

- ✓ Ekspresja *TET1* i *TET2* w rakach endometrium jest niższa w porównaniu z tkanką prawidłową. Natomiast, w przeciwieństwie do *TET1* i *TET2*, ekspresja *TET3* jest wyższa w nowotworach bardziej agresywnych, o mniejszym stopniu zróżnicowania w porównaniu do nowotworów mniej zaawansowanych;
- ✓ W przeciwieństwie do *TET1* i *TET2* nie ma korelacji między ekspresją *TET3* a poziomem 5-hydroksymetylocytozyny w DNA, co wskazuje, że rola *TET3* w raku endometrium może być odmienna od pozostałych białek TET i nie związana z jego aktywnością katalityczną;
- ✓ Obniżenie ekspresji *TET1* może być potencjalnym markerem prognostycznym w raku endometrium;
- ✓ W komórkach raka endometrium HEC-1A i Ishikawa zarówno *TET3*, jak i OGT wiążą się do regionów promotorowych genów związanych z EMT oraz uczestniczą w regulacji modyfikacji histonów, co wskazuje na ich istotny udział w procesach związanych z regulacją ekspresji tych genów;
- ✓ Istnieje współzależność między *TET3* i OGT, ponieważ zmiana ekspresji jednego z białek wpływa na zdolność wiązania do chromatyny i modyfikację histonów przez drugie białko;
- ✓ Zwiększona ekspresja *TET3* i OGT wpływa na aktywność migracyjną oraz potencjał inwazyjny komórek raka endometrium HEC-1A i Ishikawa;
- ✓ Istnieją komórkowo specyficzne różnice, dotyczące wpływu *TET3* i OGT na modyfikacje histonów i potencjał migracyjny komórek raka endometrium.

Wniosek końcowy

Uzyskane wyniki wskazują, że białka TET odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu endometrium. Ponadto istnieje współzależność między TET3 i OGT, a interakcje między tymi dwoma białkami odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne oraz wpływają na zdolność komórek do inwazji i przerzutowania.

Uzyskane wyniki wskazują jednak na złożony i komórkowo specyficzny charakter interakcji między TET3 a OGT i w związku z tym potrzebne są dalsze badania, mające na celu określenie kontekstu molekularnego i wytypowanie dodatkowych czynników mogących oddziaływać z badanymi białkami. Pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację potencjału inwazyjnego i metastatycznego komórek są niezbędne do opracowania skutecznych strategii leczenia i monitorowania postępu choroby nowotworowej, a uzyskane w trakcie rozprawy doktorskiej wyniki wskazują, że zależność między TET3 i OGT może mieć istotne znaczenie w przypadku raka endometrium.

10. Streszczenie

Jednym z podstawowych sposobów epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest metylacja reszt cytozyny w DNA (powstaje 5-metylocytozyna). Określony wzór metylacji DNA zależy nie tylko od przebiegu samego procesu przyłączania grup metylowych do reszt cytozyny, ale jest również wynikiem procesu pasywnej i aktywnej demetylacji DNA. Istotną rolę w demetylacji DNA odgrywają białka TET (ten-eleven translocation), których aktywność enzymatyczna polega na hydroksylacji, czyli dodaniu do cząsteczki związku grupy hydroksylowej (–OH), 5-metylocytozyny do 5-hydroksymetylocytozyny. W komórkach człowieka zidentyfikowano trzy białka TET określone jako TET1, TET2 i TET3, kodowane przez trzy różne geny. W przypadku wielu typów nowotworów stwierdza się zaburzoną ekspresję i aktywność białek TET. Wyniki przeprowadzonych badań ujawniły, że TET3 w raku endometrium zachowuje się odmiennie od pozostałych członków rodziny TET. Podczas gdy ekspresja *TET1* i *TET2* malała wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania nowotworu, to ekspresja *TET3* wzrastała. Dodatkowo, udział białek TET w regulacji ekspresji genów nie ogranicza się tylko do ich enzymatycznej aktywności. Białka TET mogą bowiem wchodzić w interakcje z białkami uczestniczącymi w modyfikacjach histonów. Jednym z białek, z którym oddziałują białka TET jest enzym O-GlcNAc transferaza (OGT). Aktywność OGT polega na przyłączaniu pojedynczych reszt cukru (N-acetyloglukozaminy) do białek, a proces ten nosi nazwę O-GlcNAcytacji. Zwiększona ekspresja genu kodującego OGT, jak również nasilony poziom O-GlcNAcytacji są cechami charakterystycznymi wielu typów nowotworów. Białka TET mogą oddziaływać z OGT umożliwiając jej transport do chromatyny, gdzie modyfikuje białka histonowe. W związku z tym kompleks OGT-TET może mieć istotny wpływ na regulację ekspresji genów. Mimo, iż wszystkie trzy białka TET wpływają na rekrutację OGT do chromatyny, sugeruje się, że kluczową rolę w tym procesie odgrywa białko TET3.

Celem rozprawy było określenie związku pomiędzy ekspresją genów *TET* i *OGT* a progresją raka endometrium oraz wpływu wzajemnych oddziaływań między TET3 i OGT na regulację ekspresji genów związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym oraz zdolność komórek raka endometrium do inwazji i przerzutowania. Badania przeprowadzono wykorzystując tkanki prawidłowe błony śluzowej macicy i tkanki nowotworowe endometrium oraz linie komórkowe raka endometrium – HEC-1A i Ishikawa.

Uzyskane wyniki badań przeprowadzonych na tkankach pobranych od pacjentek z rakiem endometrium i tkankach kontrolnych wskazują, że poziomy transkryptów *TET1* i *TET2*, ale

nie *TET3* są zmniejszone i skorelowane z poziomami 5-hmC. Ponadto, obniżenie ekspresji *TET1* może być potencjalnym markerem prognostycznym w raku endometrium.

Wyniki badań przeprowadzonych na liniach komórkowych wskazują, że istnieje współzależność między *TET3* i OGT, szczególnie w przypadku nowotworu endometrium. Interakcje między tymi dwoma białkami odgrywają rolę w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w przejście epitelialno-mezenchymalne oraz genów wpływających na zdolność komórek do inwazji i przerzutowania. Uzyskane wyniki, wskazują jednak na złożony i komórkowo specyficzny charakter interakcji między *TET3* a OGT i w związku z tym potrzebne są dalsze badania, mające na celu określenie kontekstu molekularnego i wytypowanie dodatkowych czynników mogących wpływać na aktywność tych białek. Pełne zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację potencjału inwazyjnego i metastatycznego komórek są niezbędne do opracowania skutecznych strategii leczenia i monitorowania postępu choroby nowotworowej, a uzyskane podczas realizacji rozprawy dane wskazują, że zależność między *TET3* i OGT może mieć istotne znaczenie w przypadku raka endometrium.

11. Abstract

One of the basic methods of epigenetic regulation of gene expression is the methylation of cytosine residues in DNA (5-methylcytosine is produced). A specific DNA methylation pattern depends not only on the process of attaching methyl groups to cytosine residues, but is also the result of the process of passive and active DNA demethylation. An important role in DNA demethylation is played by TET (ten-eleven translocation) proteins, whose enzymatic activity involves hydroxylation, i.e. adding a hydroxyl group (–OH), 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, to the compound molecule. Three TET proteins have been identified in human cells, termed *TET1*, *TET2* and *TET3*, encoded by three different genes. In many types of cancer, impaired expression and activity of TET proteins is found. The results of the conducted research revealed that *TET3* behaves differently in endometrial cancer than other members of the TET family. While the expression of *TET1* and *TET2* decreased with increasing tumor stage, the expression of *TET3* increased. Additionally, the participation of TET proteins in the regulation of gene expression is not limited only to their enzymatic activity. TET proteins may interact with proteins involved in histone modifications. One of the proteins with which TET proteins interact is the enzyme O-GlcNAc transferase (OGT). OGT activity involves the attachment of single sugar residues (N-acetylglucosamine) to proteins, and this process is called

O-GlcNAcylation. Increased expression of the gene encoding OGT as well as increased levels of O-GlcNAcylation are characteristic features of many types of cancer. TET proteins can interact with OGT, allowing it to be transported to chromatin, where it modifies histone proteins. Therefore, the OGT-TET complex may have a significant impact on the regulation of gene expression. Although all three TET proteins influence the recruitment of OGT to chromatin, it is suggested that the TET3 protein plays a key role in this process. The aim of the dissertation was to determine the relationship between the expression of *TET* and *OGT* genes and the progression of endometrial cancer, as well as the impact of the interactions between TET3 and OGT on the regulation of the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition and the ability of endometrial cancer cells to invade and metastasize. The research was carried out using normal tissues of the uterine mucosa and endometrial cancer tissues, as well as endometrial cancer cell lines - HEC-1A and Ishikawa. The results of studies carried out on tissues collected from patients with endometrial cancer and control tissues indicate that the levels of TET1 and TET2 transcripts, but not TET3, are reduced and correlated with the levels of 5-hmC. Moreover, the reduction of TET1 expression may be a potential prognostic marker in endometrial cancer. The results of studies conducted on cell lines indicate that there is a correlation between TET3 and OGT, especially in the case of endometrial cancer. The interactions between these two proteins play a role in regulating the expression of genes involved in the epithelial-mesenchymal transition and genes influencing the ability of cells to invade and metastasize. However, the obtained results indicate the complex and cell-specific nature of the interactions between TET3 and OGT, and therefore further research is needed to determine the molecular context and identify additional factors that may influence the activity of these proteins. A complete understanding of the mechanisms responsible for regulating the invasive and metastatic potential of cells is necessary to develop effective treatment strategies and monitoring the progression of cancer, and the data obtained during the dissertation indicate that the relationship between TET3 and OGT may be important in the case of endometrial cancer.

12. Bibliografia

1. Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., Malinge, S., Yao, J., Kilpivaara, O., Bhat, R., Huberman, K., Thomas, S., Dolgalev, I., Heguy, A., Paietta, E., Le Beau, M. M., Beran, M., Tallman, M. S., Ebert, B. L., Kantarjian, H. M., ... Levine, R. L. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, 114(1), 144–147. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-210039>
2. Abe, Y., Ijichi, N., Ikeda, K., Kayano, H., Horie-Inoue, K., Takeda, S., & Inoue, S. (2012). Forkhead box transcription factor, forkhead box A1, shows negative association with lymph node status in endometrial cancer, and represses cell proliferation and migration of endometrial cancer cells. *Cancer science*, 103(4), 806–812. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02201.x>
3. Ali, A., Kim, S. H., Kim, M. J., Choi, M. Y., Kang, S. S., Cho, G. J., Kim, Y. S., Choi, J. Y., & Choi, W. S. (2017). O-GlcNAcylation of NF- κ B Promotes Lung Metastasis of Cervical Cancer Cells via Upregulation of CXCR4 Expression. *Molecules and cells*, 40(7), 476–484. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2309>
4. An, J., González-Avalos, E., Chawla, A., Jeong, M., López-Moyado, I. F., Li, W., Goodell, M. A., Chavez, L., Ko, M., & Rao, A. (2015). Acute loss of TET function results in aggressive myeloid cancer in mice. *Nature communications*, 6, 10071. <https://doi.org/10.1038/ncomms10071>
5. Asakura, T., Yamaguchi, N., Ohkawa, K., & Yoshida, K. (2015). Proteasome inhibitor-resistant cells cause EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1. *International journal of oncology*, 46(5), 2251–2260. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2916>
6. Balamurugan K. (2016). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International journal of cancer*, 138(5), 1058–1066. <https://doi.org/10.1002/ijc.29519>
7. Baldini, S. F., Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., Mir, A. M., Mortuaire, M., Lefebvre, T., & Guinez, C. (2016). Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. *Biochemical and biophysical research communications*, 478(2), 942–948. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.056>
8. Bauer, C., Göbel, K., Nagaraj, N., Colantuoni, C., Wang, M., Müller, U., Kremmer, E., Rottach, A., & Leonhardt, H. (2015). Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT). *The Journal of biological chemistry*, 290(8), 4801–4812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.605881>
9. Biwi, J., Clarisse, C., Biot, C., Kozak, R. P., Madunic, K., Mortuaire, M., Wuhrer, M., Spencer, D., Schulz, C., Guerardel, Y., Lefebvre, T., & Vercoutter-Edouart, A. S. (2019). OGT Controls the Expression and the Glycosylation of E-cadherin, and Affects Glycosphingolipid Structures in Human Colon Cell Lines. *Proteomics*, 19(21-22), e1800452. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800452>

10. Blaschke, K., Ebata, K. T., Karimi, M. M., Zepeda-Martínez, J. A., Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D. J., Hirst, M., Rao, A., Lorincz, M. C., & Ramalho-Santos, M. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500(7461), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature12362>
11. Booth, M. J., Branco, M. R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., & Balasubramanian, S. (2012). Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6083), 934–937. <https://doi.org/10.1126/science.1220671>
12. Bostick, M., Kim, J. K., Estève, P. O., Clark, A., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845), 1760–1764. <https://doi.org/10.1126/science.1147939>
13. Bronowicka-Kłys, D. E., Roszak, A., Pawlik, P., Sajdak, S., Sowińska, A., & Jagodziński, P. P. (2017). Transcript levels of ten-eleven translocation type 1-3 in cervical cancer and non-cancerous cervical tissues. *Oncology letters*, 13(5), 3921–3927. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5930>
14. Bullen, J. W., Balsbaugh, J. L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Neumann, D., & Hart, G. W. (2014). Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *The Journal of biological chemistry*, 289(15), 10592–10606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.523068>
15. Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
16. Cartron, P. F., Nadaradjane, A., Lepape, F., Lalier, L., Gardie, B., & Vallette, F. M. (2013). Identification of TET1 Partners That Control Its DNA-Demethylating Function. *Genes & cancer*, 4(5-6), 235–241. <https://doi.org/10.1177/1947601913489020>
17. Champattanachai, V., Netsirisawan, P., Chaiyawat, P., Phueaouan, T., Charoenwattanasatien, R., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., Srisomsap, C., & Svasti, J. (2013). Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics*, 13(14), 2088–2099. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200126>
18. Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., & Yu, X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, 493(7433), 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature11742>
19. Chen, D., Maruschke, M., Hakenberg, O., Zimmermann, W., Stief, C. G., & Buchner, A. (2017). TOP2A, HELLS, ATAD2, and TET3 Are Novel Prognostic Markers in Renal Cell Carcinoma. *Urology*, 102, 265.e1–265.e7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2016.12.050>

20. Chen, H., Yu, D., Fang, R., Rabidou, K., Wu, D., Hu, D., Jia, P., Zhao, Z., Wu, Z., Peng, J., Shi, Y., & Shi, Y. G. (2019). TET2 stabilization by 14-3-3 binding to the phosphorylated Serine 99 is deregulated by mutations in cancer. *Cell research*, 29(3), 248–250. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0132-5>
21. Cheng, J., Guo, S., Chen, S., Mastriano, S. J., Liu, C., D'Alessio, A. C., Hysolli, E., Guo, Y., Yao, H., Megyola, C. M., Li, D., Liu, J., Pan, W., Roden, C. A., Zhou, X. L., Heydari, K., Chen, J., Park, I. H., Ding, Y., Zhang, Y., ... Lu, J. (2013). An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell reports*, 5(2), 471–481. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.050>
22. Chotirat, S., Thongnoppakhun, W., Wanachiwanawin, W., & Auewarakul, C. U. (2015). Acquired somatic mutations of isocitrate dehydrogenases 1 and 2 (IDH1 and IDH2) in preleukemic disorders. *Blood cells, molecules & diseases*, 54(3), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2014.11.017>
23. Chung, T. K., Lau, T. S., Cheung, T. H., Yim, S. F., Lo, K. W., Siu, N. S., Chan, L. K., Yu, M. Y., Kwong, J., Doran, G., Barroilhet, L. M., Ng, A. S., Wong, R. R., Wang, V. W., Mok, S. C., Smith, D. I., Berkowitz, R. S., & Wong, Y. F. (2012). Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *International journal of cancer*, 130(5), 1036–1045. <https://doi.org/10.1002/ijc.26060>
24. Ciccarone, F., Valentini, E., Zampieri, M., & Caiafa, P. (2015). 5mC-hydroxylase activity is influenced by the PARylation of TET1 enzyme. *Oncotarget*, 6(27), 24333–24347. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4476>
25. Ciesielski, P., Józwiak, P., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Cwonda, Ł., Szczepaniec, S., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., & Krześlak, A. (2017). Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695017>
26. Cimmino, L., Abdel-Wahab, O., Levine, R. L., & Aifantis, I. (2011). TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. *Cell stem cell*, 9(3), 193–204. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.08.007>
27. Cimmino, L., Dawlaty, M. M., Ndiaye-Lobry, D., Yap, Y. S., Bakogianni, S., Yu, Y., Bhattacharyya, S., Shaknovich, R., Geng, H., Lobry, C., Mullenders, J., King, B., Trimarchi, T., Aranda-Orgilles, B., Liu, C., Shen, S., Verma, A. K., Jaenisch, R., & Aifantis, I. (2015). TET1 is a tumor suppressor of hematopoietic malignancy. *Nature immunology*, 16(6), 653–662. <https://doi.org/10.1038/ni.3148>
28. Cohen, A. L., Holmen, S. L., & Colman, H. (2013). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Current neurology and neuroscience reports*, 13(5), 345. <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0345-4>
29. Comer, F. I., & Hart, G. W. (2000). O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *The Journal of biological chemistry*, 275(38), 29179–29182. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000010200>

30. Cui, Q., Yang, S., Ye, P., Tian, E., Sun, G., Zhou, J., Sun, G., Liu, X., Chen, C., Murai, K., Zhao, C., Azizian, K. T., Yang, L., Warden, C., Wu, X., D'Apuzzo, M., Brown, C., Badie, B., Peng, L., Riggs, A. D., ... Shi, Y. (2016). Downregulation of TLX induces TET3 expression and inhibits glioblastoma stem cell self-renewal and tumorigenesis. *Nature communications*, 7, 10637. <https://doi.org/10.1038/ncomms10637>
31. Dang, L., Jin, S., & Su, S. M. (2010). IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. *Trends in molecular medicine*, 16(9), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.002>
32. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, 463(7279), 364–368. <https://doi.org/10.1038/nature08697>
33. Dawlaty, M. M., Breiling, A., Le, T., Raddatz, G., Barrasa, M. I., Cheng, A. W., Gao, Q., Powell, B. E., Li, Z., Xu, M., Faull, K. F., Lyko, F., & Jaenisch, R. (2013). Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Developmental cell*, 24(3), 310–323. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.015>
34. Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
35. De Keersmaecker, K., Atak, Z. K., Li, N., Vicente, C., Patchett, S., Girardi, T., Gianfelici, V., Geerdens, E., Clappier, E., Porcu, M., Lahortiga, I., Lucà, R., Yan, J., Hulselmans, G., Vranckx, H., Vandepoel, R., Sweron, B., Jacobs, K., Mentens, N., Wlodarska, I., ... Cools, J. (2013). Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 45(2), 186–190. <https://doi.org/10.1038/ng.2508>
36. DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>
37. De Queiroz, R. M., Carvalho, E., & Dias, W. B. (2014). O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Frontiers in oncology*, 4, 132. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00132>
38. Delatte, B., & Fuks, F. (2013). TET proteins: on the frenetic hunt for new cytosine modifications. *Briefings in functional genomics*, 12(3), 191–204. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt010>
39. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguié, F., ... Bernard, O. A. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*, 360(22), 2289–2301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069>

40. Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M. K., Defrance, M., Méndez, J., Murphy, N., Dawson, M. A., Volkmar, M., Putmans, P., Calonne, E., Shih, A. H., Levine, R. L., Bernard, O., Mercher, T., Solary, E., Urh, M., Daniels, D. L., & Fuks, F. (2013). TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *The EMBO journal*, 32(5), 645–655. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.357>
41. Ding, F., Yu, L., Wang, M., Xu, S., Xia, Q., & Fu, G. (2013). O-GlcNAcylation involvement in high glucose-induced cardiac hypertrophy via ERK1/2 and cyclin D2. *Amino acids*, 45(2), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1504-2>
42. Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 446(5), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s00428-005-1264-9>
43. Du, C., Kurabe, N., Matsushima, Y., Suzuki, M., Kahyo, T., Ohnishi, I., Tanioka, F., Tajima, S., Goto, M., Yamada, H., Tao, H., Shinmura, K., Konno, H., & Sugimura, H. (2015). Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 18(3), 516–525. <https://doi.org/10.1007/s10120-014-0409-4>
44. Dubový, P., Hradilová-Svíženská, I., Klusáková, I., Kokošová, V., Brázda, V., & Joukal, M. (2018). Bilateral activation of STAT3 by phosphorylation at the tyrosine-705 (Y705) and serine-727 (S727) positions and its nuclear translocation in primary sensory neurons following unilateral sciatic nerve injury. *Histochemistry and cell biology*, 150(1), 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1656-y>
45. Elia, F. A., Yan, E., & Walter, M. A. (2017). FOXO1, the new player in the cancer sandbox. *Oncotarget*, 9(8), 8165–8178. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22742>
46. Fay, J. R., Steele, V., & Crowell, J. A. (2009). Energy homeostasis and cancer prevention: the AMP-activated protein kinase. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 2(4), 301–309. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-08-0166>
47. Feng, G., Wang, X., Cao, X., Shen, L., & Zhu, J. (2014). ZEB1 expression in endometrial biopsy predicts lymph node metastases in patient with endometrial cancer. *Disease markers*, 2014, 680361. <https://doi.org/10.1155/2014/680361>
48. Ferrer, C. M., Lynch, T. P., Sodi, V. L., Falcone, J. N., Schwab, L. P., Peacock, D. L., Vocadlo, D. J., Seagroves, T. N., & Reginato, M. J. (2014). O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Molecular cell*, 54(5), 820–831. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.026>
49. Ferrer, C. M., Lu, T. Y., Bacigalupa, Z. A., Katsetos, C. D., Sinclair, D. A., & Reginato, M. J. (2017). O-GlcNAcylation regulates breast cancer metastasis via SIRT1 modulation of FOXM1 pathway. *Oncogene*, 36(4), 559–569. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.228>

50. Ficiz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S., & Reik, W. (2011). Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*, 473(7347), 398–402. <https://doi.org/10.1038/nature10008>
51. Frauer, C., Hoffmann, T., Bultmann, S., Casa, V., Cardoso, M. C., Antes, I., & Leonhardt, H. (2011). Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain. *PloS one*, 6(6), e21306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021306>
52. Fu, X., Jin, L., Wang, X., Luo, A., Hu, J., Zheng, X., Tsark, W. M., Riggs, A. D., Ku, H. T., & Huang, W. (2013). MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(44), 17892–17897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317397110>
53. Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H. H., Igarashi, K., Kanno, J., Ohtake, F., Kitagawa, H., Roeder, R. G., Brown, M., & Kato, S. (2011). GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*, 480(7378), 557–560. <https://doi.org/10.1038/nature10656>
54. Gao, Y., Wells, L., Comer, F. I., Parker, G. J., & Hart, G. W. (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *The Journal of biological chemistry*, 276(13), 9838–9845. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010420200>
55. Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T. C., Lee, Y. S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K. I., De Marzo, A. M., Van Eyk, J. E., Mendell, J. T., & Dang, C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–765. <https://doi.org/10.1038/nature07823>
56. Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., & Carell, T. (2010). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PloS one*, 5(12), e15367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>
57. Goldberg, H., Whiteside, C., & Fantus, I. G. (2011). O-linked β -N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 301(4), E713–E726. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00108.2011>
58. Goll, M. G., & Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry*, 74, 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
59. Grin, I., & Ishchenko, A. A. (2016). An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucleic acids research*, 44(8), 3713–3727. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw059>

60. Gu, Y., Mi, W., Ge, Y., Liu, H., Fan, Q., Han, C., Yang, J., Han, F., Lu, X., & Yu, W. (2010). GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer research*, 70(15), 6344–6351. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1887>
61. Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W., Xie, Z. G., Shi, L., He, X., Jin, S. G., Iqbal, K., Shi, Y. G., Deng, Z., Szabó, P. E., Pfeifer, G. P., Li, J., & Xu, G. L. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477(7366), 606–610. <https://doi.org/10.1038/nature10443>
62. Guinez, C., Filhoulaud, G., Rayah-Benhamed, F., Marmier, S., Dubuquoy, C., Dentin, R., Moldes, M., Burnol, A. F., Yang, X., Lefebvre, T., Girard, J., & Postic, C. (2011). O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*, 60(5), 1399–1413. <https://doi.org/10.2337/db10-0452>
63. Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. L., & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*, 145(3), 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>
64. Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H. P., Klein, H. U., Dugas, M., Ogawa, S. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 28(2), 241–247. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.336>
65. Haffner, M. C., Chaux, A., Meeker, A. K., Esopi, D. M., Gerber, J., Pellakuru, L. G., Toubaji, A., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Nelson, W. G., Netto, G. J., De Marzo, A. M., & Yegnasubramanian, S. (2011). Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget*, 2(8), 627–637. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.316>
66. Han, C., Gu, Y., Shan, H., Mi, W., Sun, J., Shi, M., Zhang, X., Lu, X., Han, F., Gong, Q., & Yu, W. (2017). O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress. *Nature communications*, 8(1), 1491. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01654-6>
67. Hanover, J. A., Yu, S., Lubas, W. B., Shin, S. H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J., & Love, D. C. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of biochemistry and biophysics*, 409(2), 287–297. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00578-7](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00578-7)
68. Hanover, J. A., Krause, M. W., & Love, D. C. (2010). The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochimica et biophysica acta*, 1800(2), 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017>
69. Hart, G. W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., & Lagerlof, O. (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annual review of biochemistry*, 80, 825–858. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>

70. Hashimoto, H., Zhang, X., & Cheng, X. (2012a). Excision of thymine and 5-hydroxymethyluracil by the MBD4 DNA glycosylase domain: structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic acids research*, 40(17), 8276–8284. <https://doi.org/10.1093/nar/gks628>
71. Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A. K., Chang, Y., Howerton, S. B., Vertino, P. M., Zhang, X., & Cheng, X. (2012b). Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic acids research*, 40(11), 4841–4849. <https://doi.org/10.1093/nar/gks155>
72. He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., Sun, Y., Li, X., Dai, Q., Song, C. X., Zhang, K., He, C., & Xu, G. L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), 1303–1307. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>
73. He, Y., Roth, C., Turkenburg, J. P., & Davies, G. J. (2014). Three-dimensional structure of a *Streptomyces svaceus* GNAT acetyltransferase with similarity to the C-terminal domain of the human GH84 O-GlcNAcase. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 70 (Pt 1), 186–195. <https://doi.org/10.1107/S1399004713029155>
74. Hevir-Kene, N., & Rižner, T. L. (2015). The endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1A, and the control cell line HIEEC, differ in expression of estrogen biosynthetic and metabolic genes, and in androstenedione and estrone-sulfate metabolism. *Chemico-biological interactions*, 234, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.11.015>
75. Huang, J., Huen, M. S., Kim, H., Leung, C. C., Glover, J. N., Yu, X., & Chen, J. (2009). RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair. *Nature cell biology*, 11(5), 592–603. <https://doi.org/10.1038/ncb1865>
76. Huang, Y., & Rao, A. (2014). Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer. *Trends in genetics: TIG*, 30(10), 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.005>
77. Hurtado-Guerrero, R., Dorfmueller, H. C., & van Aalten, D. M. (2008). Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation. *Current opinion in structural biology*, 18(5), 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.09.005>
78. Iqbal, K., Jin, S. G., Pfeifer, G. P., & Szabó, P. E. (2011). Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(9), 3642–3647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014033108>
79. Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>

80. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
81. Ito, R., Katsura, S., Shimada, H., Tsuchiya, H., Hada, M., Okumura, T., Sugawara, A., & Yokoyama, A. (2014). TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 19(1), 52–65. <https://doi.org/10.1111/gtc.12107>
82. Ittel, A., Jeandidier, E., Helias, C., Perrusson, N., Humbrecht, C., Lioure, B., Mazurier, I., Mayeur-Rousse, C., Lavaux, A., Thiebault, S., Lerintiu, F., Gervais, C., & Mauvieux, L. (2013). First description of the t(10;11)(q22;q23)/MLL-TET1 translocation in a T-cell lymphoblastic lymphoma, with subsequent lineage switch to acute myelomonocytic myeloid leukemia. *Haematologica*, 98(12), e166–e168. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.096750>
83. Iyer, S. P., & Hart, G. W. (2003). Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *The Journal of biological chemistry*, 278(27), 24608–24616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300036200>
84. Jackstadt, R., van Hooff, S. R., Leach, J. D., Cortes-Lavaud, X., Lohuis, J. O., Ridgway, R. A., Wouters, V. M., Roper, J., Kendall, T. J., Roxburgh, C. S., Horgan, P. G., Nixon, C., Nourse, C., Gunzer, M., Clark, W., Hedley, A., Yilmaz, O. H., Rashid, M., Bailey, P., Biankin, A. V., ... Sansom, O. J. (2019). Epithelial NOTCH Signaling Rewires the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer to Drive Poor-Prognosis Subtypes and Metastasis. *Cancer cell*, 36(3), 319–336.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.003>
85. Jang, T. J., & Kim, U. J. (2016). O-GlcNAcylation is associated with the development and progression of gastric carcinoma. *Pathology, research and practice*, 212(7), 622–630. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.04.002>
86. Jankowska, A. M., Szpurka, H., Tiu, R. V., Makishima, H., Afafe, M., Huh, J., O'Keefe, C. L., Ganetzky, R., McDevitt, M. A., & Maciejewski, J. P. (2009). Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 113(25), 6403–6410. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-205690>
87. Jeltsch A. (2006). On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics*, 1(2), 63–66. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2767>
88. Jeon, J. H., Suh, H. N., Kim, M. O., Ryu, J. M., & Han, H. J. (2014). Glucosamine-induced OGT activation mediates glucose production through cleaved Notch1 and FoxO1, which coordinately contributed to the regulation of maintenance of self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Stem cells and development*, 23(17), 2067–2079. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0583>
89. Jiang, D., Zhang, Y., Hart, R. P., Chen, J., Herrup, K., & Li, J. (2015). Alteration in 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic regulation leads to Purkinje cell

vulnerability in ATM deficiency. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 12), 3520–3536. <https://doi.org/10.1093/brain/awv284>

90. Jiang, D., Wei, S., Chen, F., Zhang, Y., & Li, J. (2017). TET3-mediated DNA oxidation promotes ATR-dependent DNA damage response. *EMBO reports*, 18(5), 781–796. <https://doi.org/10.15252/embr.201643179>
91. Jiang, M., Xu, B., Li, X., Shang, Y., Chu, Y., Wang, W., Chen, D., Wu, N., Hu, S., Zhang, S., Li, M., Wu, K., Yang, X., Liang, J., Nie, Y., & Fan, D. (2019). O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene*, 38(3), 301–316. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0435-5>
92. Jin, S. G., Jiang, Y., Qiu, R., Rauch, T. A., Wang, Y., Schackert, G., Krex, D., Lu, Q., & Pfeifer, G. P. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer research*, 71(24), 7360–7365. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2023>
93. Jin, F. Z., Yu, C., Zhao, D. Z., Wu, M. J., & Yang, Z. (2013). A correlation between altered O-GlcNAcylation, migration and with changes in E-cadherin levels in ovarian cancer cells. *Experimental cell research*, 319(10), 1482–1490. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.013>
94. Johnson, R. F., Witzel, I. I., & Perkins, N. D. (2011). p53-dependent regulation of mitochondrial energy production by the RelA subunit of NF- κ B. *Cancer research*, 71(16), 5588–5597. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4252>
95. Jóźwiak, P., Forma, E., Bryś, M., & Krześlak, A. (2014). O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. *Frontiers in endocrinology*, 5, 145. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00145>
96. Kamigaito, T., Okaneya, T., Kawakubo, M., Shimojo, H., Nishizawa, O., & Nakayama, J. (2014). Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 17(1), 18–22. <https://doi.org/10.1038/pcan.2013.56>
97. Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., & Tanaka, N. (2008). p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nature cell biology*, 10(5), 611–618. <https://doi.org/10.1038/ncb1724>
98. Keembiyehetty, C. N., Krzeslak, A., Love, D. C., & Hanover, J. A. (2011). A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *Journal of cell science*, 124(Pt 16), 2851–2860. <https://doi.org/10.1242/jcs.083287>
99. Kneass, Z. T., & Marchase, R. B. (2005). Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, 280(15), 14579–14585. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414066200>
100. Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., An, J., Lamperti, E. D., Koh, K. P., Ganetzky, R., Liu, X. S., Aravind, L., Agarwal, S.,

- Maciejewski, J. P., & Rao, A. (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, 468(7325), 839–843. <https://doi.org/10.1038/nature09586>
101. Ko, M., An, J., Bandukwala, H. S., Chavez, L., Aijö, T., Pastor, W. A., Segal, M. F., Li, H., Koh, K. P., Lähdesmäki, H., Hogan, P. G., Aravind, L., & Rao, A. (2013). Modulation of TET2 expression and 5-methylcytosine oxidation by the CXXC domain protein IDAX. *Nature*, 497(7447), 122–126. <https://doi.org/10.1038/nature12052>
 102. Ko, M., An, J., Pastor, W. A., Koralov, S. B., Rajewsky, K., & Rao, A. (2015). TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunological reviews*, 263(1), 6–21. <https://doi.org/10.1111/imr.12239>
 103. Kroemer, G., & Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell*, 13(6), 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>
 104. Kroeze, L. I., van der Reijden, B. A., & Jansen, J. H. (2015). 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1855(2), 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.01.001>
 105. Krześlak, A., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Bieńkiewicz, A., & Bryś, M. (2012). Expression of genes encoding for enzymes associated with O-GlcNAcylation in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations. *Ginekologia polska*, 83(1), 22–26.
 106. Kudo, Y., Tateishi, K., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Asaoka, Y., Ijichi, H., Nagae, G., Yoshida, H., Aburatani, H., & Koike, K. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer science*, 103(4), 670–676. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x>
 107. Kundu, A., Shelar, S., Ghosh, A. P., Ballestas, M., Kirkman, R., Nam, H., Brinkley, G. J., Karki, S., Mobley, J. A., Bae, S., Varambally, S., & Sudarshan, S. (2020). 14-3-3 proteins protect AMPK-phosphorylated ten-eleven translocation-2 (TET2) from PP2A-mediated dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 295(6), 1754–1766. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011089>
 108. Kyo, S., Sakaguchi, J., Ohno, S., Mizumoto, Y., Maida, Y., Hashimoto, M., Nakamura, M., Takakura, M., Nakajima, M., Masutomi, K., & Inoue, M. (2006). High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Human pathology*, 37(4), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.12.021>
 109. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
 110. Langemeijer, S. M., Aslanyan, M. G., & Jansen, J. H. (2009). TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(24), 4044–4048. <https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10239>
 111. Laukka, T., Mariani, C. J., Ihantola, T., Cao, J. Z., Hokkanen, J., Kaelin, W. G., Jr, Godley, L. A., & Koivunen, P. (2016). Fumarate and Succinate Regulate Expression of

Hypoxia-inducible Genes via TET Enzymes. *The Journal of biological chemistry*, 291(8), 4256–4265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688762>

112. Lazarus, M. B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P., & Walker, S. (2011). Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*, 469(7331), 564–567. <https://doi.org/10.1038/nature09638>
113. Leelahavanichkul, K., Amornphimoltham, P., Molinolo, A. A., Basile, J. R., Koontongkaew, S., & Gutkind, J. S. (2014). A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Molecular oncology*, 8(1), 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.10.003>
114. Li, J., Huang, C. L., Zhang, L. W., Lin, L., Li, Z. H., Zhang, F. W., & Wang, P. (2010). Isoforms of human O-GlcNAcase show distinct catalytic efficiencies. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(7), 938–943. <https://doi.org/10.1134/s0006297910070175>
115. Li, W., & Liu, M. (2011). Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *Journal of nucleic acids*, 2011, 870726. <https://doi.org/10.4061/2011/870726>
116. Li, Y. N., Hu, J. A., & Wang, H. M. (2015). Inhibition of HIF-1 α Affects Autophagy Mediated Glycosylation in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Disease markers*, 2015, 239479. <https://doi.org/10.1155/2015/239479>
117. Li, B., Li, H., Lu, L., & Jiang, J. (2017). Structures of human O-GlcNAcase and its complexes reveal a new substrate recognition mode. *Nature structural & molecular biology*, 24(4), 362–369. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3390>
118. Lian, C. G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K., Xu, W., Tan, L., Hu, Y., Zhan, Q., Lee, C. W., Hu, D., Lian, B. Q., Kleffel, S., Yang, Y., Neiswender, J., Khorasani, A. J., Fang, R., Lezcano, C., Duncan, L. M., ... Shi, Y. G. (2012). Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*, 150(6), 1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.033>
119. Lian, H., Li, W. B., & Jin, W. L. (2016). The emerging insights into catalytic or non-catalytic roles of TET proteins in tumors and neural development. *Oncotarget*, 7(39), 64512–64525. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11412>
120. Liu, C., Liu, L., Chen, X., Shen, J., Shan, J., Xu, Y., Yang, Z., Wu, L., Xia, F., Bie, P., Cui, Y., Bian, X. W., & Qian, C. (2013). Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular carcinoma through downregulation of TET1. *PloS one*, 8(5), e62828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062828>
121. Liu, D., Li, G., & Zuo, Y. (2019). Function determinants of TET proteins: the arrangements of sequence motifs with specific codes. *Briefings in bioinformatics*, 20(5), 1826–1835. <https://doi.org/10.1093/bib/bby053>
122. López-Lázaro M. (2008). The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen?. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 8(3), 305–312. <https://doi.org/10.2174/187152008783961932>

123. Lorient, A., Van Tongelen, A., Blanco, J., Klaessens, S., Cannuyer, J., van Baren, N., Decottignies, A., & De Smet, C. (2014). A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors. *Epigenetics*, 9(8), 1163–1171. <https://doi.org/10.4161/epi.29628>
124. Lorsch, R. B., Moore, J., Mathew, S., Raimondi, S. C., Mukatira, S. T., & Downing, J. R. (2003). TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia*, 17(3), 637–641. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402834>
125. Lu, W., & Kang, Y. (2019). Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Developmental cell*, 49(3), 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.04.010>
126. Luo, B., Parker, G. J., Cooksey, R. C., Soesanto, Y., Evans, M., Jones, D., & McClain, D. A. (2007). Chronic hexosamine flux stimulates fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 282(10), 7172–7180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607362200>
127. Lynch, T. P., Ferrer, C. M., Jackson, S. R., Shahriari, K. S., Vosseller, K., & Reginato, M. J. (2012). Critical role of O-Linked β -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *The Journal of biological chemistry*, 287(14), 11070–11081. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.302547>
128. Ma, J., & Hart, G. W. (2013a). Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert review of proteomics*, 10(4), 365–380. <https://doi.org/10.1586/14789450.2013.820536>
129. Ma, Z., Vocadlo, D. J., & Vosseller, K. (2013b). Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- κ B activity in pancreatic cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(21), 15121–15130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470047>
130. Maiti, A., & Drohat, A. C. (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *The Journal of biological chemistry*, 286(41), 35334–35338. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>
131. Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X., Cong, Q., & Yu, W. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(4), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.01.009>
132. Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I., & Wang, G. (2013). Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *The Journal of biological chemistry*, 288(19), 13669–13674. <https://doi.org/10.1074/jbc.C113.464800>
133. Misawa, K., Imai, A., Mochizuki, D., Mima, M., Endo, S., Misawa, Y., Kanazawa, T., & Mineta, H. (2018). Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer. *Oncotarget*, 9(36), 24480–24493. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25333>

134. Mohr, F., Döhner, K., Buske, C., & Rawat, V. P. (2011). TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. *Experimental hematology*, 39(3), 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.12.004>
135. Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S. D., ... Levine, R. L. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer cell*, 20(1), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.001>
136. Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M. B., Marzi, S., Helfer, A. C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., Bousquet, C., Dewerchin, M., Pyronnet, S., Prats, A. C., Carmeliet, P., & Garmy-Susini, B. (2014). Hypoxia induces VEGF-C expression in metastatic tumor cells via a HIF-1 α -independent translation-mediated mechanism. *Cell reports*, 6(1), 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.011>
137. Müller, T., Gessi, M., Waha, A., Isselstein, L. J., Luxen, D., Freihoff, D., Freihoff, J., Becker, A., Simon, M., Hammes, J., Denkhäus, D., zur Mühlen, A., Pietsch, T., & Waha, A. (2012). Nuclear exclusion of TET1 is associated with loss of 5-hydroxymethylcytosine in IDH1 wild-type gliomas. *The American journal of pathology*, 181(2), 675–683. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.04.017>
138. Müller, U., Bauer, C., Siegl, M., Rottach, A., & Leonhardt, H. (2014). TET-mediated oxidation of methylcytosine causes TDG or NEIL glycosylase dependent gene reactivation. *Nucleic acids research*, 42(13), 8592–8604. <https://doi.org/10.1093/nar/gku552>
139. Nabel, C. S., Jia, H., Ye, Y., Shen, L., Goldschmidt, H. L., Stivers, J. T., Zhang, Y., & Kohli, R. M. (2012). AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nature chemical biology*, 8(9), 751–758. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1042>
140. Nakagawa, T., Lv, L., Nakagawa, M., Yu, Y., Yu, C., D'Alessio, A. C., Nakayama, K., Fan, H. Y., Chen, X., & Xiong, Y. (2015). CRL4(VprBP) E3 ligase promotes monoubiquitylation and chromatin binding of TET dioxygenases. *Molecular cell*, 57(2), 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.002>
141. Navarro, A., Yin, P., Ono, M., Monsivais, D., Moravek, M. B., Coon, J. S., 5th, Dyson, M. T., Wei, J. J., & Bulun, S. E. (2014). 5-Hydroxymethylcytosine promotes proliferation of human uterine leiomyoma: a biological link to a new epigenetic modification in benign tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 99(11), E2437–E2445. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2264>
142. Niehrs, C., & Schäfer, A. (2012). Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends in cell biology*, 22(4), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.01.002>

143. Ono, R., Taki, T., Taketani, T., Taniwaki, M., Kobayashi, H., & Hayashi, Y. (2002). LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer research*, 62(14), 4075–4080.
144. Ooi, S. K., O'Donnell, A. H., & Bestor, T. H. (2009). Mammalian cytosine methylation at a glance. *Journal of cell science*, 122(Pt 16), 2787–2791. <https://doi.org/10.1242/jcs.015123>
145. Orr, B. A., Haffner, M. C., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., & Eberhart, C. G. (2012). Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PloS one*, 7(7), e41036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041036>
146. Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., & Dang, C. V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *The Journal of biological chemistry*, 275(29), 21797–21800. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000023200>
147. Ozcan, S., Andrali, S. S., & Cantrell, J. E. (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochimica et biophysica acta*, 1799(5-6), 353–364. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.02.005>
148. Padmanaban, V., Krol, I., Suhail, Y., Szczerba, B. M., Aceto, N., Bader, J. S., & Ewald, A. J. (2019). E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer. *Nature*, 573(7774), 439–444. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1526-3>
149. Palomero, T., Couronné, L., Khiabani, H., Kim, M. Y., Ambesi-Impiombato, A., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Abate, F., Allegretta, M., Haydu, J. E., Jiang, X., Lossos, I. S., Nicolas, C., Balbin, M., Bastard, C., Bhagat, G., Piris, M. A., Campo, E., Bernard, O. A., Rabadan, R., ... Ferrando, A. A. (2014). Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nature genetics*, 46(2), 166–170. <https://doi.org/10.1038/ng.2873>
150. Park, S. Y., Kim, H. S., Kim, N. H., Ji, S., Cha, S. Y., Kang, J. G., Ota, I., Shimada, K., Konishi, N., Nam, H. W., Hong, S. W., Yang, W. H., Roth, J., Yook, J. I., & Cho, J. W. (2010). Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO journal*, 29(22), 3787–3796. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.254>
151. Phoomak, C., Vaeteewoottacharn, K., Sawanyawisuth, K., Seubwai, W., Wongkham, C., Silsirivanit, A., & Wongkham, S. (2016). Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-κB. *Scientific reports*, 6, 27853. <https://doi.org/10.1038/srep27853>
152. Roca, F. J., Loomans, H. A., Wittman, A. T., Creighton, C. J., & Hawkins, S. M. (2016). Ten-Eleven Translocation Genes are Downregulated in Endometriosis. *Current molecular medicine*, 16(3), 288–298. <https://doi.org/10.2174/1566524016666160225153844>

153. Qiao, Z., Dang, C., Zhou, B., Li, S., Zhang, W., Jiang, J., Zhang, J., Kong, R., & Ma, Y. (2012). O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT) is overexpressed and promotes O-linked protein glycosylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of biomedical research*, 26(4), 268–273. <https://doi.org/10.7555/JBR.26.20110121>
154. Qiao, Z., Dang, C., Zhou, B., Li, S., Zhang, W., Jiang, J., Zhang, J., Ma, Y., Kong, R., & Ma, Z. (2016). Downregulation of O-linked N-acetylglucosamine transferase by RNA interference decreases MMP9 expression in human esophageal cancer cells. *Oncology letters*, 11(5), 3317–3323. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4428>
155. Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C. K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M. H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., ... Bernard, O. A. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer cell*, 20(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.003>
156. Rao, F. V., Schüttelkopf, A. W., Dorfmueller, H. C., Ferenbach, A. T., Navratilova, I., & van Aalten, D. M. (2013). Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open biology*, 3(10), 130021. <https://doi.org/10.1098/rsob.130021>
157. Rao, V. K., Swarnaseetha, A., Tham, G. H., Lin, W. Q., Han, B. B., Benoukraf, T., Xu, G. L., & Ong, C. T. (2020). Phosphorylation of Tet3 by cdk5 is critical for robust activation of BRN2 during neuronal differentiation. *Nucleic acids research*, 48(3), 1225–1238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1144>
158. Romero-Pérez, L., López-García, M. Á., Díaz-Martín, J., Biscuola, M., Castilla, M. Á., Tafe, L. J., Garg, K., Oliva, E., Matias-Guiu, X., Soslow, R. A., & Palacios, J. (2013). ZEB1 overexpression associated with E-cadherin and microRNA-200 downregulation is characteristic of undifferentiated endometrial carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26(11), 1514–1524. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.93>
159. Rozanski, W., Krzeslak, A., Forma, E., Brys, M., Blewniewski, M., Wozniak, P., & Lipinski, M. (2012). Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clinical laboratory*, 58(5-6), 579–583.
160. Ruan, H. B., Singh, J. P., Li, M. D., Wu, J., & Yang, X. (2013). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 24(6), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.02.002>
161. Sacoman, J. L., Dagda, R. Y., Burnham-Marusich, A. R., Dagda, R. K., & Berninsone, P. M. (2017). Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (mOGT) Regulates Mitochondrial Structure, Function, and Survival in HeLa Cells. *The Journal of biological chemistry*, 292(11), 4499–4518. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.726752>
162. Sadłęcki, P., Jóźwicki, J., Antosik, P., & Walentowicz-Sadłęcka, M. (2020). Expression of Selected Epithelial-Mesenchymal Transition Transcription Factors in Endometrial

163. Sakabe, K., Wang, Z., & Hart, G. W. (2010). Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), 19915–19920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009023107>
164. Sakaidani, Y., Ichiyanagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., & Okajima, T. (2012). O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochemical and biophysical research communications*, 419(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.098>
165. Sakata-Yanagimoto, M., Enami, T., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Ishii, R., Miyake, Y., Muto, H., Tsuyama, N., Sato-Otsubo, A., Okuno, Y., Sakata, S., Kamada, Y., Nakamoto-Matsubara, R., Tran, N. B., Izutsu, K., Sato, Y., Ohta, Y., Furuta, J., Shimizu, S., Komeno, T., ... Chiba, S. (2014). Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nature genetics*, 46(2), 171–175. <https://doi.org/10.1038/ng.2872>
166. Sarkies, P., & Sale, J. E. (2012). Cellular epigenetic stability and cancer. *Trends in genetics : TIG*, 28(3), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.11.005>
167. Shen, J., Chen, Q., Li, N., Bai, X., Wang, F., & Li, B. (2020). TWIST1 expression and clinical significance in type I endometrial cancer and premalignant lesions: A retrospective clinical study. *Medicine*, 99(48), e23397. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023397>
168. Shi, Y., Tomic, J., Wen, F., Shaha, S., Bahlo, A., Harrison, R., Dennis, J. W., Williams, R., Gross, B. J., Walker, S., Zuccolo, J., Deans, J. P., Hart, G. W., & Spaner, D. E. (2010). Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 24(9), 1588–1598. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.152>
169. Shi, F. T., Kim, H., Lu, W., He, Q., Liu, D., Goodell, M. A., Wan, M., & Songyang, Z. (2013). Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by O-linked N-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(29), 20776–20784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.460386>
170. Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., & Dang, C. V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6658–6663. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6658>
171. Singh, M., Spoelstra, N. S., Jean, A., Howe, E., Torkko, K. C., Clark, H. R., Darling, D. S., Shroyer, K. R., Horwitz, K. B., Broaddus, R. R., & Richer, J. K. (2008). ZEB1 expression in type I vs type II endometrial cancers: a marker of aggressive disease. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 21(7), 912–923. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.82>

172. Singh, J. P., Qian, K., Lee, J. S., Zhou, J., Han, X., Zhang, B., Ong, Q., Ni, W., Jiang, M., Ruan, H. B., Li, M. D., Zhang, K., Ding, Z., Lee, P., Singh, K., Wu, J., Herzog, R. I., Kaech, S., Wendel, H. G., Yates, J. R., 3rd, ... Yang, X. (2020). O-GlcNAcase targets pyruvate kinase M2 to regulate tumor growth. *Oncogene*, 39(3), 560–573. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0975-3>
173. Slawson, C., Copeland, R. J., & Hart, G. W. (2010). O-GlcNAc signaling: a metabolic link between diabetes and cancer?. *Trends in biochemical sciences*, 35(10), 547–555. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.005>
174. Song, S. J., Ito, K., Ala, U., Kats, L., Webster, K., Sun, S. M., Jongen-Lavrencic, M., Manova-Todorova, K., Teruya-Feldstein, J., Avigan, D. E., Delwel, R., & Pandolfi, P. P. (2013a). The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation. *Cell stem cell*, 13(1), 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.06.003>
175. Song, S. J., Poliseno, L., Song, M. S., Ala, U., Webster, K., Ng, C., Beringer, G., Brikbak, N. J., Yuan, X., Cantley, L. C., Richardson, A. L., & Pandolfi, P. P. (2013b). MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*, 154(2), 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026>
176. Soni, S., & Padwad, Y. S. (2017). HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 56(4), 503–515. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2017.1301680>
177. Solary, E., Bernard, O. A., Tefferi, A., Fuks, F., & Vainchenker, W. (2014). The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia*, 28(3), 485–496. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.337>
178. Stroynowska-Czerwinska, A., Piasecka, A., & Bochtler, M. (2018). Specificity of MLL1 and TET3 CXXC domains towards naturally occurring cytosine modifications. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1861(12), 1093–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.10.009>
179. Su, P. H., Hsu, Y. W., Huang, R. L., Chen, L. Y., Chao, T. K., Liao, C. C., Chen, C. W., Wu, T. I., Mao, S. P., Balch, C., & Lai, H. C. (2019). TET1 promotes 5hmC-dependent stemness, and inhibits a 5hmC-independent epithelial-mesenchymal transition, in cervical precancerous lesions. *Cancer letters*, 450, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.033>
180. Suvà, M. L., Riggi, N., & Bernstein, B. E. (2013). Epigenetic reprogramming in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1567–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1230184>
181. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>

182. Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature reviews. Immunology*, 18(5), 309–324. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.142>
183. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
184. Toleman, C., Paterson, A. J., Whisenhunt, T. R., & Kudlow, J. E. (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *The Journal of biological chemistry*, 279(51), 53665–53673. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410406200>
185. Tong, X., Zhao, F., Mancuso, A., Gruber, J. J., & Thompson, C. B. (2009). The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21660–21665. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911316106>
186. Torres, C. R., & Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of biological chemistry*, 259(5), 3308–3317.
187. Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
188. Trinca, G. M., Goodman, M. L., Papachristou, E. K., D'Santos, C. S., Chalise, P., Madan, R., Slawson, C., & Hagan, C. R. (2018). O-GlcNAc-Dependent Regulation of Progesterone Receptor Function in Breast Cancer. *Hormones & cancer*, 9(1), 12–21. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0310-9>
189. Tsai, Y. P., Chen, H. F., Chen, S. Y., Cheng, W. C., Wang, H. W., Shen, Z. J., Song, C., Teng, S. C., He, C., & Wu, K. J. (2014). TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome biology*, 15(12), 513. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0513-0>
190. Van Damme, M., Crompot, E., Meuleman, N., Maerevoet, M., Mineur, P., Bron, D., Lagneaux, L., & Stamatopoulos, B. (2016). Characterization of TET and IDH gene expression in chronic lymphocytic leukemia: comparison with normal B cells and prognostic significance. *Clinical epigenetics*, 8, 132. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0298-y>
191. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

192. Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A., Roberto, A., Christensen, J., Bonaldi, T., Helin, K., & Pasini, D. (2013). Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Molecular cell*, 49(4), 645–656. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.12.019>
193. Vocadlo D. J. (2012). O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Current opinion in chemical biology*, 16(5-6), 488–497. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.021>
194. Voutsadakis I. A. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *Journal of clinical medicine*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.3390/jcm5010011>
195. Wakahara, R., Kunimoto, H., Tanino, K., Kojima, H., Inoue, A., Shintaku, H., & Nakajima, K. (2012). Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 17(2), 132–145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x>
196. Wang, Y., Liu, J., Jin, X., Zhang, D., Li, D., Hao, F., Feng, Y., Gu, S., Meng, F., Tian, M., Zheng, Y., Xin, L., Zhang, X., Han, X., Aravind, L., & Wei, M. (2017). O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13732–13737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1704145115>
197. Ward, P. S., & Thompson, C. B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer cell*, 21(3), 297–308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>
198. Wen, L., & Tang, F. (2014). Genomic distribution and possible functions of DNA hydroxymethylation in the brain. *Genomics*, 104(5), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.020>
199. Wieland, E., Rodriguez-Vita, J., Liebler, S. S., Mogler, C., Moll, I., Herberich, S. E., Espinet, E., Herpel, E., Menuchin, A., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., Gebhardt, C., Brenner, H., Trumpp, A., Siebel, C. W., Hecker, M., Utikal, J., Sprinzak, D., & Fischer, A. (2017). Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis. *Cancer cell*, 31(3), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.007>
200. Wielscher, M., Liou, W., Pulverer, W., Singer, C. F., Rappaport-Fuerhauser, C., Kandioler, D., Egger, G., & Weinhäusel, A. (2013). Cytosine 5-Hydroxymethylation of the LZTS1 Gene Is Reduced in Breast Cancer. *Translational oncology*, 6(6), 715–721. <https://doi.org/10.1593/tlo.13523>
201. Williams, K., Christensen, J., Pedersen, M. T., Johansen, J. V., Cloos, P. A., Rappsilber, J., & Helin, K. (2011). TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, 473(7347), 343–348. <https://doi.org/10.1038/nature10066>

202. Winterhoff, B., Thomaier, L., Mullany, S., & Powell, M. A. (2020). Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 32(1), 76–83. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000602>
203. Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., & Walter, J. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nature communications*, 2, 241. <https://doi.org/10.1038/ncomms1240>
204. Wrabl, J. O., & Grishin, N. V. (2001). Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *Journal of molecular biology*, 314(3), 365–374. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5151>
205. Wu, H., D'Alessio, A. C., Ito, S., Xia, K., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y. E., & Zhang, Y. (2011). Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 473(7347), 389–393. <https://doi.org/10.1038/nature09934>
206. Wu, D., Hu, D., Chen, H., Shi, G., Fetahu, I. S., Wu, F., Rabidou, K., Fang, R., Tan, L., Xu, S., Liu, H., Argueta, C., Zhang, L., Mao, F., Yan, G., Chen, J., Dong, Z., Lv, R., Xu, Y., Wang, M., ... Shi, Y. G. (2018). Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature*, 559(7715), 637–641. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0350-5>
207. Wu, C. J., Sundararajan, V., Sheu, B. C., Huang, R. Y., & Wei, L. H. (2019). Activation of STAT3 and STAT5 Signaling in Epithelial Ovarian Cancer Progression: Mechanism and Therapeutic Opportunity. *Cancers*, 12(1), 24. <https://doi.org/10.3390/cancers12010024>
208. Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., Zhao, S., Ye, D., Xiong, Y., & Guan, K. L. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes & development*, 26(12), 1326–1338. <https://doi.org/10.1101/gad.191056.112>
209. Xie, X., Zheng, X., Wang, J., & Chen, L. (2017). Clinical significance of Twist, E-cadherin, and N-cadherin protein expression in endometrioid adenocarcinoma. *Journal of cancer research and therapeutics*, 13(5), 817–822. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_405_17
210. Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., Ito, S., Yang, C., Wang, P., Xiao, M. T., Liu, L. X., Jiang, W. Q., Liu, J., Zhang, J. Y., Wang, B., Frye, S., Zhang, Y., Xu, Y. H., Lei, Q. Y., Guan, K. L., ... Xiong, Y. (2011a). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell*, 19(1), 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014>
211. Xu, Y., Wu, F., Tan, L., Kong, L., Xiong, L., Deng, J., Barbera, A. J., Zheng, L., Zhang, H., Huang, S., Min, J., Nicholson, T., Chen, T., Xu, G., Shi, Y., Zhang, K., & Shi, Y. G. (2011b). Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1

- hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Molecular cell*, 42(4), 451–464. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.005>
212. Xu, Y. Y., Tian, J., Hao, Q., & Yin, L. R. (2016). MicroRNA-495 downregulates FOXC1 expression to suppress cell growth and migration in endometrial cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(1), 239–251. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3686-6>
 213. Xu, C., Liu, G. D., Feng, L., Zhang, C. H., & Wang, F. (2018). Identification of O-GlcNAcylation Modification in Diabetic Retinopathy and Crosstalk with Phosphorylation of STAT3 in Retina Vascular Endothelium Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 49(4), 1389–1402. <https://doi.org/10.1159/000493444>
 214. Xu, D., Wang, W., Bian, T., Yang, W., Shao, M., & Yang, H. (2019). Increased expression of O-GlcNAc transferase (OGT) is a biomarker for poor prognosis and allows tumorigenesis and invasion in colon cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 12(4), 1305–1314.
 215. Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., & Bigner, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*, 360(8), 765–773. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>
 216. Yang, W. H., Park, S. Y., Nam, H. W., Kim, D. H., Kang, J. G., Kang, E. S., Kim, Y. S., Lee, H. C., Kim, K. S., & Cho, J. W. (2008a). NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(45), 17345–17350. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806198105>
 217. Yang, X., Ongusaha, P. P., Miles, P. D., Havstad, J. C., Zhang, F., So, W. V., Kudlow, J. E., Michell, R. H., Olefsky, J. M., Field, S. J., & Evans, R. M. (2008b). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, 451(7181), 964–969. <https://doi.org/10.1038/nature06668>
 218. Yang, H., Liu, Y., Bai, F., Zhang, J. Y., Ma, S. H., Liu, J., Xu, Z. D., Zhu, H. G., Ling, Z. Q., Ye, D., Guan, K. L., & Xiong, Y. (2013). Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 32(5), 663–669. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.67>
 219. Yang, X., & Qian, K. (2017). Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(7), 452–465. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.22>
 220. Ye, Z., Li, J., Han, X., Hou, H., Chen, H., Zheng, X., Lu, J., Wang, L., Chen, W., Li, X., & Zhao, L. (2016). TET3 inhibits TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition by demethylating miR-30d precursor gene in ovarian cancer cells. *Journal of*

experimental & clinical cancer research : CR, 35, 72. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0350-y>

221. Yi, W., Clark, P. M., Mason, D. E., Keenan, M. C., Hill, C., Goddard, W. A., 3rd, Peters, E. C., Driggers, E. M., & Hsieh-Wilson, L. C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6097), 975–980. <https://doi.org/10.1126/science.1222278>
222. Yin, R., Mao, S. Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., Jiao, Y., Li, C., Liu, S., Wu, D., Gu, W., Yang, Y. G., Xu, G. L., & Wang, H. (2013). Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *Journal of the American Chemical Society*, 135(28), 10396–10403. <https://doi.org/10.1021/ja4028346>
223. Zhang, H., Zhang, X., Clark, E., Mulcahey, M., Huang, S., & Shi, Y. G. (2010). TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine. *Cell research*, 20(12), 1390–1393. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.156>
224. Zhang, P., Huang, B., Xu, X., & Sessa, W. C. (2013). Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(3), 368–373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.082>
225. Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J., & Wong, J. (2014). Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *The Journal of biological chemistry*, 289(9), 5986–5996. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524140>
226. Zhang, Y. W., Wang, Z., Xie, W., Cai, Y., Xia, L., Easwaran, H., Luo, J., Yen, R. C., Li, Y., & Baylin, S. B. (2017). Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress. *Molecular cell*, 65(2), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.013>
227. Zhang, T., Guan, X., Choi, U. L., Dong, Q., Lam, M., Zeng, J., Xiong, J., Wang, X., Poon, T., Zhang, H., Zhang, X., Wang, H., Xie, R., Zhu, B., & Li, G. (2019). Phosphorylation of TET2 by AMPK is indispensable in myogenic differentiation. *Epigenetics & chromatin*, 12(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0281-x>
228. Zhang, T., Zhao, Y., Zhao, Y., & Zhou, J. (2020). Expression and prognosis analysis of TET family in acute myeloid leukemia. *Aging*, 12(6), 5031–5047. <https://doi.org/10.18632/aging.102928>
229. Zhang, Y. W., Wang, Z., Xie, W., Cai, Y., Xia, L., Easwaran, H., Luo, J., Yen, R. C., Li, Y., & Baylin, S. B. (2017). Acetylation Enhances TET2 Function in Protecting against Abnormal DNA Methylation during Oxidative Stress. *Molecular cell*, 65(2), 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.12.013>
230. Zhao, Z., Chen, L., Dawlaty, M. M., Pan, F., Weeks, O., Zhou, Y., Cao, Z., Shi, H., Wang, J., Lin, L., Chen, S., Yuan, W., Qin, Z., Ni, H., Nimer, S. D., Yang, F. C.,

- Jaenisch, R., Jin, P., & Xu, M. (2015). Combined Loss of Tet1 and Tet2 Promotes B Cell, but Not Myeloid Malignancies, in Mice. *Cell reports*, 13(8), 1692–1704. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.037>
231. Zhao, L., Shah, J. A., Cai, Y., & Jin, J. (2018). 'O-GlcNAc Code' Mediated Biological Functions of Downstream Proteins. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(8), 1967. <https://doi.org/10.3390/molecules23081967>
232. Zhong, J., Li, X., Cai, W., Wang, Y., Dong, S., Yang, J., Zhang, J., Wu, N., Li, Y., Mao, F., Zeng, C., Wu, J., Xu, X., & Sun, Z. S. (2017). TET1 modulates H4K16 acetylation by controlling auto-acetylation of hMOF to affect gene regulation and DNA repair function. *Nucleic acids research*, 45(2), 672–684. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw919>
233. Zhu, Q., Zhou, L., Yang, Z., Lai, M., Xie, H., Wu, L., Xing, C., Zhang, F., & Zheng, S. (2012). O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical oncology* (Northwood, London, England), 29(2), 985–993. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9912-1>

13. Załączniki

Spis załączników:

Załącznik 1:

Publikacja 1 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Cwonda, Ł., Szczepaniec, S., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., & Krześlak, A. (2017). **Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695017>

Załącznik 2:

Publikacja 2 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Forma, E., & Krześlak, A. (2021). **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer.** *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>

Załącznik 3:

‘Supplementary materials’ do Publikacji 2 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Forma, E., & Krześlak, A. (2021). **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer.** *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>

Załącznik 4:

Wyniki badań, które nie zostały zamieszczone w publikacjach.

Załącznik 5:

Oświadczenia współautorów

Załącznik 1:

Publikacja 1 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Cwonda, Ł., Szczepaniec, S., Bieńkiewicz, A., Bryś, M., & Krześlak, A. (2017). **Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers.** *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695017. <https://doi.org/10.1177/1010428317695017>

Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers

Tumor Biology

March 2017: 1–8

© The Author(s) 2017

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1010428317695017

journals.sagepub.com/home/tub



Piotr Ciesielski¹, Paweł Józwiak¹, Katarzyna Wójcik-Krowiranda²,
Ewa Forma¹, Łukasz Cwonda², Sylwia Szczepaniec²,
Andrzej Bieńkiewicz², Magdalena Bryś¹ and Anna Krześlak¹

Abstract

Ten-eleven translocation proteins are α -ketoglutarate-dependent dioxygenases involved in the conversion of 5-methylcytosines (5-mC) to 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), 5-formylcytosine, and 5-carboxylcytosine that play a significant role in DNA demethylation. Deregulation of *TET* genes expression and changes in the level of 5-hmC are thought to be associated with the onset and progression of several types of cancer, but there are no such data related to endometrial cancer. The aim of the work was to investigate the messenger RNA expression levels of *TET1*, *TET2*, and *TET3* in relation to clinicopathological characteristics of endometrial cancer as well as the correlation between expression of *TET* genes and the level of 5-hmC/5-mC. The prognostic significance of *TETs* expression for overall survival was established. We found that *TET1* and *TET2* messenger RNA expression was lower and *TET3* was higher in cancers compared to normal tissues. Positive correlation between 5-hmC and the relative expression of *TET1* and *TET2* was found, but no correlation was observed in the case of *TET3*. Decreased expression of *TET1* and *TET2* was significantly associated with increased lymph node metastasis and International Federation of Gynecology and Obstetrics stage. Kaplan–Meier analysis indicated that low *TET1* expression predicted poor overall survival ($p = 0.038$). Multivariate analysis identified the *TET1* expression in endometrial cancer as an independent prognostic factor. Our results suggest that decreased expression of *TET1* correlates with tumor progression and may serve as a potential prognostic biomarker in endometrial cancer.

Keywords

Ten-eleven translocation, 5-hydroxymethylcytosine, prognostic factor, endometrial cancer

Date received: 8 July 2016; accepted: 10 January 2017

Introduction

Tumor cells are characterized by significant changes in the DNA methylation pattern as compared to normal cells. In tumor cells, a global hypomethylation of the genome is observed. At the same time, an increased level of methylation (hypermethylation) of CpG islands in the promoter sequences of certain genes can be noticed. The global hypomethylation can lead to activation of proto-oncogenes and to reduced genomic stability through an increased activation of transposons, which are normally silenced by methylation. In turn, the hypermethylation of CpG islands in promoter regions of tumor suppressor genes and DNA repair genes can contribute to carcinogenesis by inhibiting the expression of these genes.^{1–3} A specific DNA methylation pattern is determined not only by the attachment of methyl group to

cytosine but also as a result of the process of DNA demethylation.^{4,5} Ten-eleven translocation (TET) protein family plays a significant role in changing the pattern of DNA methylation, through participation in DNA demethylation.⁶ In human, three TET proteins, named TET1, TET2, and TET3, have been identified.⁷ These proteins are iron(II)- and

¹Department of Cytochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Łódź, Poland

²Clinical Division of Gynecological Oncology, Medical University of Lodz, Łódź, Poland

Corresponding author:

Anna Krześlak, Department of Cytochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Łódź, Poland.

Email: krzeslak@biol.uni.lodz.pl



Creative Commons Non Commercial CC-BY-NC: This article is distributed under the terms of the Creative Commons

Attribution-NonCommercial 3.0 License (<http://www.creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits non-commercial use, reproduction and distribution of the work without further permission provided the original work is attributed as specified on the SAGE and Open Access pages (<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>).

2-ketoglutarate-dependent dioxygenases. TET proteins catalyze the conversion of the 5-methylcytosine into 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), and further to 5-formylcytosine (5-fC) and 5-carboxylcytosine (5-caC), which initiates the process of DNA demethylation.^{8–10} To date, a number of studies confirmed the important role of TET proteins in the DNA demethylation and their relationship with changes in DNA methylation pattern in tumors. TET proteins seem to be also involved in the regulation of other epigenetic modifications, that is, the modification of histones by interacting with specific proteins responsible for these modifications and their recruitment to chromatin.¹¹ Reduced expression of TET at the gene and protein levels as well as changes in the level of 5-hmC is thought to be associated with the development and progression of several types of cancer, but there are no such data related to endometrial cancer.

Endometrial cancer is the third most frequent gynecologic malignancy worldwide.¹² Endometrial cancer is a multifactorial disease, and the molecular mechanism underlying its development and progression is poorly understood. However, it is suggested that several aberrations in genes expression may be involved.¹³

The aim of our study was to analyze the messenger RNA (mRNA) expression levels of *TET1*, *TET2*, and *TET3* and their correlation with 5-hmC/5-mC levels, clinical features, and patient survival. Our results demonstrated that especially decreased expression of *TET1* correlates with tumor progression, and it is an unfavorable prognostic indicator for patients with endometrial cancer.

Materials and methods

Patients and tissue samples

Samples of endometrial cancer were obtained from 131 patients who underwent surgery in the Department of Gynecological Oncology Copernicus Memorial Hospital (Łódź, Poland) from February 2009 to March 2016. Samples of normal endometrial tissues were obtained from 51 patients who had undergone hysterectomy due to leiomyoma or a uterus prolapse. Tissue samples after tumor resection were immediately placed in RNAlater (Ambion, USA). Samples were subsequently stored at -80°C until RNA and DNA extraction.

All cancer samples were characterized in terms of tumor stage according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria, histological grade and type according to World Health Organization (WHO) classification, infiltration into muscularis, the ability of cancer cells to metastasize to lymph nodes, and coexistence of endometrial hyperplasia. Clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. The follow-up period was defined as the interval from the date of surgery to the date of death or last follow-up. The latest follow-up was updated in March 2016.

Table 1. Characteristics of patients and endometrial cancer samples.

Characteristic	Number of patients (%)
Control samples	
Patients age (59.15 ± 9.15 years)	51
Endometrial cancer samples	
Patients age (63.54 ± 10.16 years)	131
FIGO stage	
I	87 (66.4)
II	15 (11.4)
III	25 (19.1)
IV	4 (3.1)
Histological grade	
G1	29 (22.1)
G2	81 (61.8)
G3	21 (16.1)
Depth of myometrial invasion	
<1/2	66 (50.4)
>1/2	65 (49.6)
Hyperplasia	
No	101 (77.1)
Yes	30 (22.9)
Lymph node metastasis	
No	112 (85.5)
Yes	19 (14.5)

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from normal and cancer tissue samples was isolated using Trizol[®] Reagent (Sigma Aldrich, USA) according to manufacturer's protocol and quantified spectrophotometrically. The reverse transcription of 2 μg of RNA was performed using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) following manufacturer's instructions. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in a thermocycler GeneAMP 2400 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, USA) according to the following thermal profile: 10 min at 25°C , 120 min at 37°C , and 5 min at 85°C .

Quantitative real-time PCR analysis

The relative expression levels of *TET1*, *TET2*, and *TET3* were analyzed by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the TaqMan[®] Gene Expression Assays (Life Technology, USA) according to manufacturer's instructions. The assay numbers for studied genes were as follows: Hs00286756_m1, Hs00325999_m1, Hs00379125_m1, and Hs02800695_m1 (reference gene: *HPRT1*). Each PCR reaction was performed in a 10 μL volume which included 1 μL of complementary DNA (cDNA), 3.5 μL of water, 5 μL of $2 \times$ TaqMan Universal PCR MasterMix (Life Technology, USA), and 0.5 μL of TaqMan Gene Expression Assays which consisted of a pair of unlabeled PCR primer and a

TaqMan probe with FAM™ dye label on the 5' end and minor groove binder (MGB) nonfluorescent quencher on the 3' end. The following PCR program was used: 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 s, 1 min annealing and extension at 60°C. PCR reactions were carried out using the Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Germany). The equation $1000 \times 2^{-\Delta Ct}$ was applied to calculate the expression of studied genes, where $\Delta Ct = Ct$ of the target gene $- Ct$ of the reference gene (*HPRT1*). Results are expressed as number of target gene mRNA copies per 1000 copies of *HPRT1* mRNA.

DNA extraction

The phase remaining after isolation of RNA was mixed with ethanol, incubated at room temperature for 5 min, and centrifuged for 10 min at $10,000 \times g$. Supernatant was removed and 1 mL of 0.1 M citrate solution in 10% ethanol was added to the pellet; probes were incubated for at least 30 min at room temperature, stirring occasionally by inverting the tube, and then centrifuged for 10 min at $10,000 \times g$. Washing with citrate was done three times. After removing the supernatant, pellet was washed with 75% ethanol and incubated for 20 min at room temperature and centrifuged for 10 min at $12,000 \times g$. The DNA pellet was dried at 37°C. The precipitate was suspended in an appropriate amount of 8 mM NaOH, incubated at 37°C for 15 min, and vortexed vigorously until complete dissolution of DNA. After last centrifugation at $16,000 \times g$ for 10 min, supernatant containing the DNA was transferred to a new tube.

Global 5-mC and 5-hmC measurement

MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, USA) and MethylFlash™ Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Epigentek, USA), respectively, were used for the quantification of global 5-mC and 5-hmC in DNA according to manufacturer's instructions. In both assays, hydroxymethylated and methylated fractions of DNA were detected using capture and detection antibodies through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-like reaction. Absorbance was read in a microplate spectrophotometer at 450 nm. Because of high specificity, these assays are able to distinguish between 5-hmC, 5-mC, and C.

Statistical analysis

Differences in expression levels of *TET1*, *TET2*, and *TET3* between studied groups were analyzed using non-parametric Kruskal–Wallis test with the post hoc Dunn test. Correlations between *TET* genes expression and level of 5-hmC/5-mC in DNA were analyzed using Spearman test. Survival curves were calculated using the Kaplan–Meier method and compared by the log-rank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed on all characteristics (age, FIGO stage, histological grade, tumor

stage, lymph nodal status, and myometrial infiltration) through the Cox proportional hazard regression model. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Expression of *TET1*, *TET2*, and *TET3* in endometrial cancer

Expression levels of *TET1*, *TET2*, and *TET3* in samples of endometrial cancers and normal endometrial tissues were evaluated by real-time quantitative PCR analysis with the *HPRT1* gene applied as a reference and correlated with clinical and pathomorphological data (Figure 1). Analysis showed that the mean mRNA expressions of *TET1* and *TET2* were significantly lower in cancer samples than in normal tissues samples. In more advanced tumors, classified as stage III and IV, the expression of *TET1* and *TET2* was lower than in tumors less advanced, corresponding to the first and second stage according to FIGO classification (Figure 1(a)). There were no significant differences ($p > 0.05$) in *TET1* and *TET2* mRNA expression between tumors of different grade (Figure 1(b)). However, *TET1* and *TET2* expressions were lower in tumors that exhibited the ability to metastasize to regional lymph nodes compared to non-metastatic cancers (Figure 1(c)).

In contrast to the results obtained for *TET1* and *TET2*, the relative mRNA expression of the *TET3* was higher in the cancer samples compared to normal tissues. There were no significant differences ($p > 0.05$) in *TET3* expression between tumors in different stage of development according to FIGO classification, but *TET3* mRNA expression showed a tendency to increase with increasing tumor histological grade (Figure 1(a) and (b)).

Analysis did not reveal significant differences ($p > 0.05$) in the expression of all three *TET* genes between samples in which the infiltration did not exceed half the thickness of muscle ($< 1/2$) and those in which infiltration included more than half the thickness of muscle ($\geq 1/2$). There was a statistically significant decrease in expression of the *TET1* in the tumor samples characterized by coexistence of hyperplasia compared to those in which there was no excessive growth ($p < 0.05$).

Correlation between 5-mC and 5-hmC levels and *TETs* expression

The cancer samples showed slightly increased level of 5-mC and decreased level of 5-hmC compared to control samples. However, both 5-mC and 5-hmC levels showed no significant association with clinicopathological parameters such as tumor stage, histological grade, depth of myometrial invasion, hyperplasia coexistence, and lymph node metastasis (data not shown). The percentage of 5-hmC in the total DNA (5-hmC %) was correlated

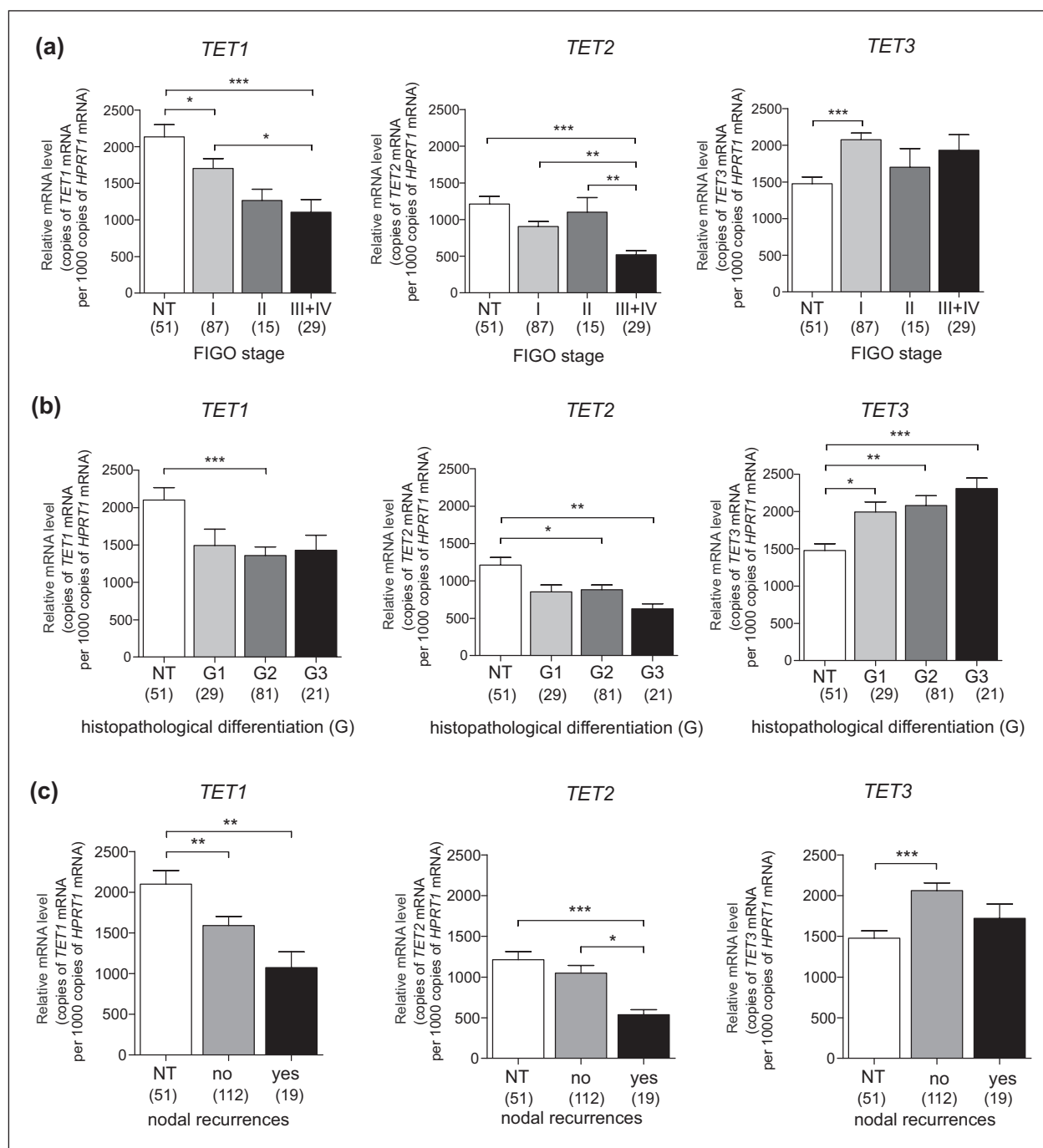


Figure 1. Expression of *TET1*, *TET2*, and *TET3* mean mRNA measured by real-time PCR in control and endometrial cancer samples; (a) a comparison between subgroups with different FIGO stage, (b) histological differentiation grade, and (c) lymph node metastasis status. The results are shown as number of each TET mRNA copies per 1000 copies of *HPRT1* mRNA (reference gene). Graphs represent mean $\pm$ SEM. The number of cases in each group is shown in parentheses. NT: non-tumor (control) samples; G1, G2, G3: histopathological grade according to WHO classification; I, II, III, IV: tumor stage according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

with the relative expression of *TET1*, *TET2* and *TET3* in the same sample. Positive correlation between 5-hmC % and the relative expression of *TET1* ($r=0.3755$) and *TET2* ($r=0.3184$) was observed, but no correlation was

observed in the case of *TET3* (Figure 2). There was no statistically significant correlation between expression of *TET* genes and the level of DNA methylation (data not shown).

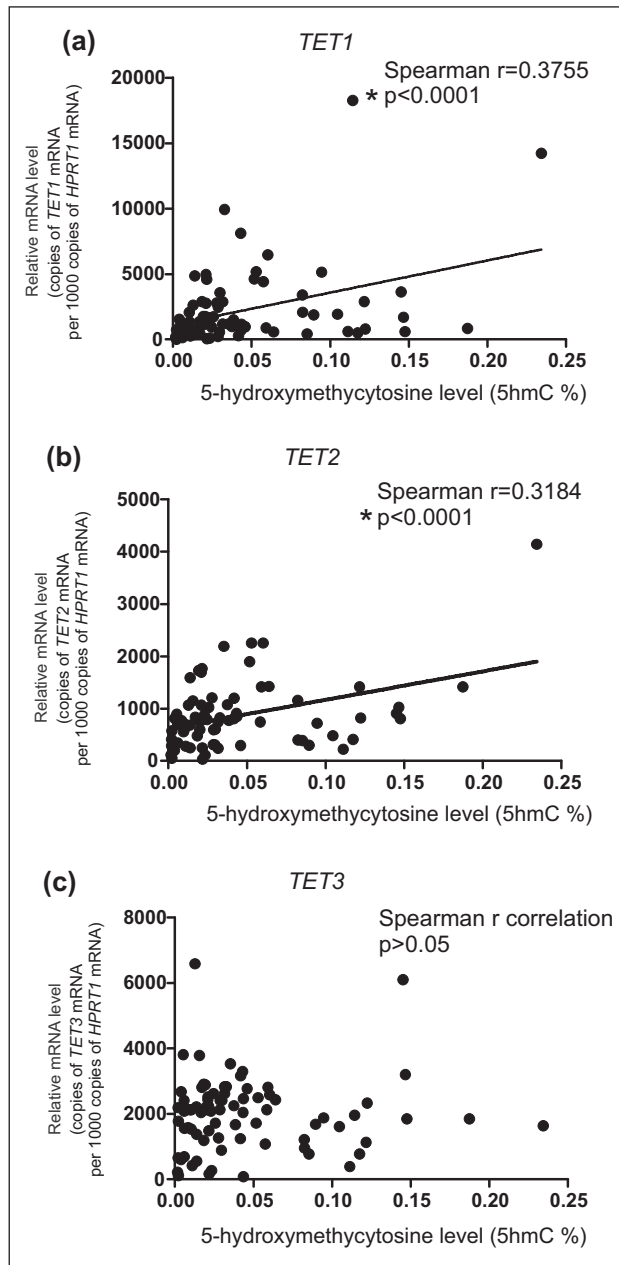


Figure 2. Correlation between *TETs* expression and the level of 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC %). Spearman rank correlation analysis was performed to analyze the association of (a) *TET1*, (b) *TET2*, and (c) *TET3* expression with 5-hmC level in endometrial cancer samples. *5-hmC level was significantly associated only with *TET1* ($r=0.375$, $p<0.0001$) and *TET2* ($r=0.318$, $p<0.0001$) expression levels.

TET1 status and endometrial cancer prognosis

The 66 endometrial cancer patients who underwent surgery before March 2011 were classified into high and low *TET1*, *TET2*, or *TET3* expression subgroups using their median expression value as the cutoff point. Kaplan–Meier survival analysis was used to estimate the predictive effect of *TET1*, *TET2*, and *TET3* expressions on overall survival.

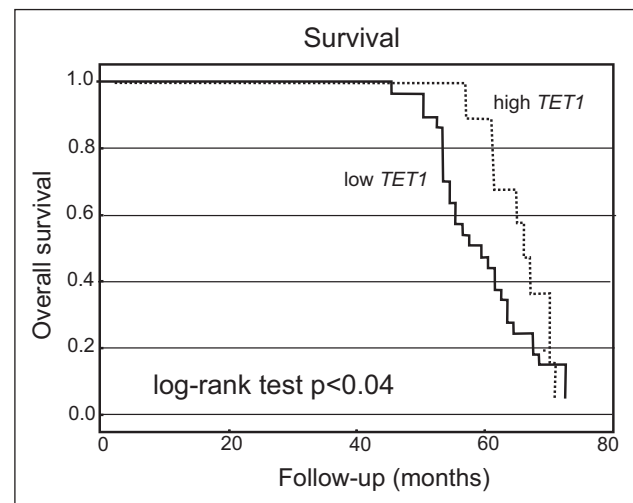


Figure 3. Kaplan–Meier curve showing overall survival for endometrial cancer patients with low and high levels of *TET1* mRNA expression. The cutoff value was established to be the median of the *TET1* mRNA level. The survival curve was compared between two groups: high ($\geq$ median value) and low ($<$ median value) expression. Patients in the low *TET1* expression group had a significantly shorter overall survival than those in the high *TET1* expression group. $N=66$ (number of cases).

Overall survival differences in case of *TET2* and *TET3* were not statistically significant. The Kaplan–Meier analysis showed that patients in the low *TET1* expression group had a significantly shorter overall survival than those in the high *TET1* group (5-year survival, log-rank test, $p<0.04$, Figure 3).

To assess whether *TET1* expression represents an independent prognostic indicator in endometrial cancer, the effect of each variable on survival was determined by the Cox regression analysis. Univariate analyses revealed that *TET1* expression, FIGO stage, grade, tumor size, and nodal status were significantly associated with overall survival (Table 2). The variables that significantly correlated with survival in the univariate analysis were further assessed by multivariate analysis. The results of the multivariate analysis confirmed that *TET1* expression was an independent prognostic factor for overall survival with endometrial cancer (hazard ratio: 0.509, 95% confidence interval (95% CI)=0.127–0.779, $p=0.038$) (Table 2).

Discussion

Reduced 5-hmC levels have been found in numerous solid tumors including glioma, melanoma, breast, colon, liver, lung, prostate, and pancreatic cancers.^{14–24} It has been found that low 5-hmC levels correlate with poor survival in glioma, melanoma, breast, and liver cancers.^{14–16,20} The results of many studies suggest that the reduced 5-hmC level is associated with reduced expression of *TETs*.^{17,23,20–22,24}

Table 2. Univariate and multivariate analyses of TET1 expression and clinicopathological factors influencing patients' survival.

Characteristics	Variation	n	%	Mean survival (months $\pm$ SD)	Univariate analysis			Multivariate analysis		
					HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
TET1 expression	High	38	58	51.39 (17.53)						
	Low	28	42	44.68 (22.78)	0.571	0.143–0.952	0.038	0.509	0.127–0.779	0.038
Age (years)	>50	53	80	46.81 (20.66)						
	$\leq$ 50	13	20	61.00 (9.46)	0.762	0.267–1.118	0.641	–	–	–
FIGO	III–IV	13	20	27.84 (24.45)						
	I–II	53	80	53.73 (15.15)	2.016	1.156–3.472	0.021	2.754	1.017–3.947	0.27
Grade	G3	21	32	25.81 (19.93)						
	G2–G1	45	68	54.44 (15.48)	3.514	1.239–7.169	0.007	4.162	2.671–6.019	0.032
pT	T3–T4	19	29	26.14 (23.06)						
	T1–T2	47	71	55.34 (12.73)	2.152	1.243–2.794	0.018	2.385	1.073–3.439	0.15
pN	N1–N2	19	29	25.17 (24.13)						
	N0	47	71	56.24 (14.09)	7.215	2.180–16.276	0.001	3.118	1.492–5.073	0.002
Myometrial infiltration	>1/2	31	47	49.23 (18.31)						
	<1/2	35	53	42.61 (20.83)	1.045	0.437–1.833	0.732	–	–	–

HR: hazard ratio; CI: confidence interval, pT: tumor size, pN: lymph node status.

According to our knowledge, there are no data concerning the expression of *TETs* and 5-hmC level in endometrial cancer. Navarro et al.²⁵ studied expression of *TET* genes in uterine leiomyomas which are benign smooth muscle tumors of myometrial origin. They found higher expression of TET1 and TET3 on both mRNA and protein levels, but not TET2, in leiomyoma tissue compared to normal myometrial tissue. Navarro et al.²⁵ demonstrated that the up-regulation of *TET1* and *TET3* in leiomyoma tissue was associated with increase of 5-hmC level.

The results of our studies of endometrial cancer similarly to most studies of other malignant tumors showed decreased expression of *TET1* and *TET2* in cancers compared to control samples. Our finding of higher expression of *TET3* mRNA level in cancers than in control stands in contrast to most previous findings in malignant tumors which showed usually lower mRNA expression of all *TET* genes. However, there were some exceptions. In diffuse intrinsic pontine glioma, both *TET1* and *TET3* expressions were increased compared to normal tissue, and in esophageal squamous cell carcinoma, *TET3* expression was higher than in matched normal esophageal mucosa.^{26,27} Our studies showed positive correlation of 5-hmC levels with *TET1* and *TET2* expression but not *TET3*. Previous studies of human cancers also showed that *TETs* were not equally involved in 5-mC hydroxylation. For example, Du et al.¹⁸ found that in gastric cancers the global 5-hmC levels were significantly and positively correlated with TET1 expression, but not with TET2/3. Decreased expression of *TETs*, but especially TET2, seems to be a key mechanism responsible for reduced level of 5-hmC in melanoma and esophageal squamous cell carcinoma.^{16,27} The exact function of each TET protein in regulating the 5-hmC level is still unclear. The recent studies suggest that all *TETs*

hydroxylate of 5-mC to 5-hmC, but only TET2 and TET3 are responsible for subsequent removal of 5-hmC in the cytosine demethylation cascade.²⁸

Our results may suggest that the role of TET3 in endometrial cancer is different from that of TET1 and TET2 and may be independent of its catalytic activity. The three TET proteins share high percentage of sequence homology in the region surrounding the catalytic C-terminal domain, and they have similar enzymatic activity. However, the distinctive regions of each protein suggest that each TET possesses a unique binding affinity to chromatin or interacts with different proteins. Thus, it is possible that each TET can play a specific role depending on cell types and different stages of tumor development. Although most studies were focused on the enzymatic roles of TET family proteins, a few investigations reported a non-catalytic activity of TET proteins. For example, it has been found that TET1 interacts with hypoxia-inducible factors (HIFs) and increases hypoxia responsive gene expression. TET1 also interacts with the SIN3A co-repressor complex leading to transcriptional repression of many TET1-targeted genes.^{29–31} TET2 and TET3 can interact with O-GlcNAc transferase (OGT), and these interactions promote GlcNAcylation and increase H3K4me3 through the SET1/COMPASS complex.³² Non-catalytic activities of *TETs* cause that except tumor-suppressing function they also have tumor-promoting function. Thus, we speculate that *TETs* may also play a dual function in endometrial tumorigenesis.

A variety of mechanisms in human tumors may interfere either directly or indirectly with *TETs* expression, including *TET* mutations, upstream regulators of TET genes, and methylation of *TET* genes. The differences in transcript levels of *TETs* may dependent also on different

microRNA (miRNA) expression. There are several miRNAs that have been proved to affect the *TETs* transcript levels. Among miRNAs that directly regulate the levels of *TETs* are miR-29, miR-26, miR-22, miR-101, miR-105, miR-125, and miR767.^{33–36} Most of these miRNAs affect transcript levels of all *TETs*. However, some of them showed preferential effect on *TET* transcripts. Zhang et al.³³ found that the number of binding sites seems to influence the sensitivity of *TET* transcripts by miR-29 as *TET3* has the most predicted sites and is the most significantly regulated *TET* by miR-29 in human dermal fibroblasts and vascular smooth muscle cells. In melanoma cell lines, it has been shown that miR-767 can function as a regulator of cellular 5-hmC levels via targeting of *TET* genes, but miR-767 has exhibited a preferential effect on *TET1*.³⁷ Although there is data concerning mechanism of *TETs* expression regulation in endometrial cancer, it is known that deregulation of some of these miRNAs, that is, miR-101 and miR-22, are associated with endometrial carcinogenesis.^{38–40}

Our results for the first time suggest that decreased mRNA expression of *TET1* correlates with tumor progression and may serve as a potential prognostic biomarker in endometrial cancer. Analysis revealed that lower *TET1* expression in tumors significantly predicted poorer overall survival. However, our study included relatively small group of patients, and a well-designed large-scale study is necessary to confirm our results.

In conclusion, our study demonstrates that *TET1* and *TET2* but not *TET3* transcript levels in endometrial cancer tissues are reduced and correlated with 5-hmC levels. *TET1* downregulation may be a potential prognostic marker in endometrial cancer. Further studies are needed to explain the significance of individual *TETs* alteration in onset and progression of endometrial cancer.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Ethical approval

We declare that all experiments were performed in accordance with the current law of Poland. The investigations were approved by the Bioethical Commissions of Medical University of Lodz and University of Lodz.

Funding

This study was supported in part by statutory funds of University of Lodz and by grant from the National Science Centre of Poland UMO-2015/19/N/NZ3/01311.

References

1. Dawson MA and Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150: 12–27.
2. You JS and Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 2012; 22: 9–20.
3. Suvà ML, Riggi N and Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013; 339: 1567–1570.
4. Bhutani N, Burns DM and Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell* 2011; 146: 866–872.
5. Gutierrez-Arcelus M, Lappalainen T, Montgomery SB, et al. Passive and active DNA methylation and the interplay with genetic variation in gene regulation. *Elife* 2013; 2: e00523.
6. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930–935.
7. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood* 2009; 114: 144–147.
8. Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011; 333: 1300–1303.
9. Guo JU, Su Y, Zhong C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 2011; 145: 423–434.
10. Kroeze LI, van der Reijden BA and Jansen JH. 5-Hydroxymethylcytosine: an epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1855: 144–154.
11. Ciesielski P, Józwiak P and Krześlak A. TET proteins and epigenetic modifications in cancers. *Postepy Hig Med Dosw* 2015; 69: 1371–1383.
12. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 87–108.
13. Matias-Guiu X and Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology* 2013; 62: 111–123.
14. Rawluszko-Wieczorek AA, Siera A and Jagodziński PP. TET proteins in cancer: current ‘state of the art’. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 96: 425–436.
15. Orr BA, Haffner MC, Nelson WG, et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PLoS ONE* 2012; 7: e41036.
16. Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* 2012; 150: 1135–1146.
17. Hsu CH, Peng KL, Kang ML, et al. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep* 2012; 2: 568–579.
18. Du C, Kurabe N, Matsushima Y, et al. Robust quantitative assessments of cytosine modifications and changes in the expressions of related enzymes in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015; 18: 516–525.
19. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, et al. Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* 2011; 2: 627–637.
20. Jin SG, Jiang Y, Qiu R, et al. 5-Hydroxymethylcytosine is strongly depleted in human cancers but its levels do not correlate with IDH1 mutations. *Cancer Res* 2011; 71: 7360–7365.
21. Liu C, Liu L, Chen X, et al. Decrease of 5-hydroxymethylcytosine is associated with progression of hepatocellular

- carcinoma through downregulation of TET1. *PLoS ONE* 2013; 8: e62828.
22. Wielscher M, Liou W, Pulverer W, et al. Cytosine 5-hydroxymethylation of the LZTS1 gene is reduced in breast cancer. *Transl Oncol* 2013; 6: 715–721.
 23. Yang H, Liu Y, Bai F, et al. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 2013; 32: 663–669.
 24. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 2012; 103: 670–676.
 25. Navarro A, Yin P, Ono M, et al. 5-Hydroxymethylcytosine promotes proliferation of human uterine leiomyoma: a biological link to a new epigenetic modification in benign tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: E2437–E2445.
 26. Ahsan S, Raabe EH, Haffner MC, et al. Increased 5-hydroxymethylcytosine and decreased 5-methylcytosine are indicators of global epigenetic dysregulation in diffuse intrinsic pontine glioma. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 59.
 27. Murata A, Baba Y, Ishimoto T, et al. TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 23372–23382.
 28. Putiri EL, Tiedemann RL, Thompson JJ, et al. Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. *Genome Biol* 2014; 15: R81.
 29. Tsai YP, Chen HF, Chen SY, et al. TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol* 2014; 15: 513.
 30. Williams K, Christensen J, Pedersen MT, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 2011; 473: 343–348.
 31. Lian H, Li WB and Jin WL. The emerging insights into catalytic or non-catalytic roles of TET proteins in tumors and neural development. *Oncotarget* 2016; 7: 64512–64525.
 32. Deplus R, Delatte B, Schwinn MK, et al. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J* 2013; 32: 645–655.
 33. Zhang P, Huang B, Xu X, et al. Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 437: 368–373.
 34. Song SJ, Poliseno L, Song MS, et al. MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell* 2013; 154: 311–324.
 35. Fu X, Jin L, Wang X, et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 17892–17897.
 36. Cheng J, Guo S, Chen S, et al. An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell Rep* 2013; 5: 471–481.
 37. Lorient A, Van Tongelen A, Blanco J, et al. A novel cancer-germline transcript carrying pro-metastatic miR-105 and TET-targeting miR-767 induced by DNA hypomethylation in tumors. *Epigenetics* 2014; 9: 1163–1171.
 38. Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, et al. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Sci* 2010; 101: 241–249.
 39. Konno Y, Dong P, Xiong Y, et al. MicroRNA-101 targets EZH2, MCL-1 and FOS to suppress proliferation, invasion and stem cell-like phenotype of aggressive endometrial cancer cells. *Oncotarget* 2014; 5: 6049–6062.
 40. Li S, Hu R, Wang C, et al. miR-22 inhibits proliferation and invasion in estrogen receptor α -positive endometrial endometrioid carcinomas cells. *Mol Med Rep* 2014; 9: 2393–2399.

Załącznik 2:

Publikacja 2 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Forma, E., & Krześlak, A. (2021). **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer.** *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>



Article

TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer

Piotr Ciesielski, Paweł Józwiak , Ewa Forma and Anna Krześlak *

Department of Cytochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, 90-236 Łódź, Poland; piotr.ciesielski@biol.uni.lodz.pl (P.C.); pawel.jozwiak@biol.uni.lodz.pl (P.J.); ewa.forma@biol.uni.lodz.pl (E.F.)

* Correspondence: anna.krzeslak@biol.uni.lodz.pl

Abstract: TET3 is a member of the TET (ten-eleven translocation) proteins family that catalyzes the conversion of the 5-methylcytosine into 5-hydroxymethylcytosine. TET proteins can also affect chromatin modifications and gene expression independently of their enzymatic activity via interactions with other proteins. O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme responsible for modification of proteins via binding of *N*-acetylglucosamine residues, is one of the proteins whose action may be dependent on TET3. Here, we demonstrated that in endometrial cancer cells both TET3 and OGT affected the expression of genes involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT), i.e., *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1*. OGT overexpression was caused by an increase in *TWIST1* and *ZEB1* levels in HEC-1A and Ishikawa cells, which was associated with increased O-GlcNAcylation of histone H2B and trimethylation of H3K4. The TET3 had the opposite effect on gene expressions and histone modifications. OGT and TET3 differently affected *FOXC1* expression and the migratory potential of HEC-1A and Ishikawa cells. Analysis of gene expressions in cancer tissue samples from endometrial cancer patients confirmed the association between OGT or TET3 and EMT genes. Our results contribute to the knowledge of the role of the TET3/OGT relationship in the complex mechanism supporting endometrial cancer progression.

Keywords: endometrial cancer; TET proteins; O-GlcNAc transferase; *TWIST1*; *ZEB1*; *FOXC1*; migration; invasion



Citation: Ciesielski, P.; Józwiak, P.; Forma, E.; Krześlak, A. TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>

Academic Editor: Laura Paleari

Received: 2 November 2021

Accepted: 3 December 2021

Published: 8 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

TET family proteins play a significant role in changing the pattern of DNA methylation through participation in DNA demethylation. In humans, three TET proteins named TET1, TET2, and TET3 have been identified. These proteins are iron(II)- and 2-ketoglutarate-dependent dioxygenases, which catalyze the conversion of the 5-methylcytosine (5-mC) into 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) and further into 5-formylcytosine (5-fC) and 5-carboxycytosine (5-caC), which initiates the process of DNA demethylation [1–3]. Besides being involved in DNA demethylation, TET proteins can also affect the epigenetic modifications, regardless of their enzymatic activity by interacting with other proteins that are involved in the modification of chromatin, for example, O-GlcNAc transferase (OGT) [4–6]. OGT is an enzyme responsible for the modification (O-GlcNAcylation) of cellular proteins by linking the single *N*-acetylglucosamine moieties to serine or threonine residues by the O-glycosidic bond. This dynamic modification affects the activity and stability of a great number of proteins, including metabolic enzymes, kinases, phosphatases, transcription factors, and many others. Increased expression of OGT and hyper-O-GlcNAcylation are the hallmarks of many tumors [7–9]. It has been found that the O-GlcNAcylation may be a part of histone code, and OGT modifies H2A, H2B, H3, and H4 histones [10]. Studies using chromatin immunoprecipitation (ChIP-Seq) showed that TET1, TET2, TET3, and OGT can colocalize in H3K4me3-rich sites of chromatin in promoters of transcriptionally active genes [10,11].

It is suggested that TET proteins play an essential role in the recruitment of OGT to chromatin so that it can modify histones [4,5,12]. Chen et al. [4] demonstrated that in murine embryonic stem cells (mESC), Tet2 protein is necessary for OGT to modify histone H2B at serine 112 (H2BS112GlcNAc). Glycosylation of this serine residue facilitates the further modification of histone H2B, the monoubiquitination of lysine 120 (H2BK120Ub). Studies of Ito et al. [5] indicated that TET3 plays the main role in the recruitment of O-GlcNAc transferase to chromatin and regulates its stability.

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is a biological process in which epithelial cells experience profound changes in motility and their ability to invade surrounding tissues [13]. Major players in the regulation of EMT are transcription factors, designated as EMT-TFs, which include, among others, Zinc finger E-box-binding homeobox 1 and 2 (ZEB1 and ZEB2), and Twist-related protein 1 and 2 (TWIST1 and TWIST2). These factors take part in a complex network that activates a specific molecular program aimed at repressing epithelial markers (e.g., E-cadherin, *CDH1*) and activating mesenchymal markers (e.g., vimentin, *VIM*) [13].

The pioneer factors, a special class of transcription factors that can associate with compacted chromatin to facilitate the binding of additional transcription factors are also involved in cancer progression. The function of pioneer factors was originally described during development. More recently, they have been implicated, especially FOXA1, in hormone-dependent cancers, such as estrogen receptor-positive breast cancer and androgen receptor-positive prostate cancer [14]. The role of FOXA1 in human malignancy remains incompletely defined, as both pro- and antitumorigenic functions have been uncovered. FOXA1 is strongly associated with metastatic disease in prostatic adenocarcinoma [15]. In breast cancer, high FOXA1 expression positively correlates with the outcome, but the potential impact of its expression depends on the ER α status and tumor molecular subtype [15]. The other important factor whose role in cancer development and progression has begun to emerge is FOXC1 [16]. Although FOXC1 has not been formally confirmed as a pioneer factor it seems probable it is one since it exhibits conservation of the critical amino acids which confer pioneer activity in FOXA1. Overexpression of FOXC1 has been reported in at least 16 types of cancer, often in association with a poor prognosis [16].

Here, we demonstrate that OGT and TET3 affect the expression of genes associated with epithelial-mesenchymal transition via changes of histones modifications and the ability of endometrial cancer cells for migration and invasion.

2. Results

2.1. Effect of OGT and TET3 on the Expression of Genes Involved in EMT

The impact of changes in OGT and TET3 amounts on the expression of genes involved in epithelial-mesenchymal transition (*FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST*, *ZEB1*) in endometrial cancer cells has been analyzed. Expressions of TET3 and OGT were changed by treating HEC-1A and Ishikawa cells with plasmid vectors or siRNA (Figure 1A–D). In endometrial cancer cells with TET3 and OGT dysregulation, the expressions of *FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST*, *ZEB1* were analyzed and the results are shown for HEC-1A and Ishikawa cells in Figure 1E,F, respectively. The expressions were analyzed in cells with unchanged OGT and TET3 (control), cells with overexpression of TET3 (pTET3), cells with overexpression OGT (pOGT), and cells with overexpression both OGT and TET3 (pTET3/pOGT), and cells cotransfected with pOGT and siTET3. Changes in expression of TET3 and OGT affected the expression of *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* but did not significantly influence the expression of *FOXA1*. Overexpression of TET3 and OGT caused decreased expression of *FOXC1* in HEC1A cells and increased expression of this gene in Ishikawa cells. TET3 and OGT seem to have the opposite effect on *TWIST1* expressions both in HEC1A and Ishikawa cells, i.e., TET3 causes decreased expression and OGT causes increased expression. Expression of *ZEB1* was affected mostly by OGT, especially in Ishikawa cells. When TET3 and OGT were coexpressed, the most interesting results were found for *TWIST1*. TET3 seems to counteract the *TWIST1* expression increase caused by OGT. In the case of *ZEB1*, co-overexpression of OGT and

TET3 give the same results as overexpression of OGT alone. To confirm the results of the TET3 and OGT impact on these genes, we also analyzed the expression of genes in cells treated with siRNAs specific for TET3 or OGT. The results are shown in Supplementary Figure S1. These results support the findings from overexpression experiments.

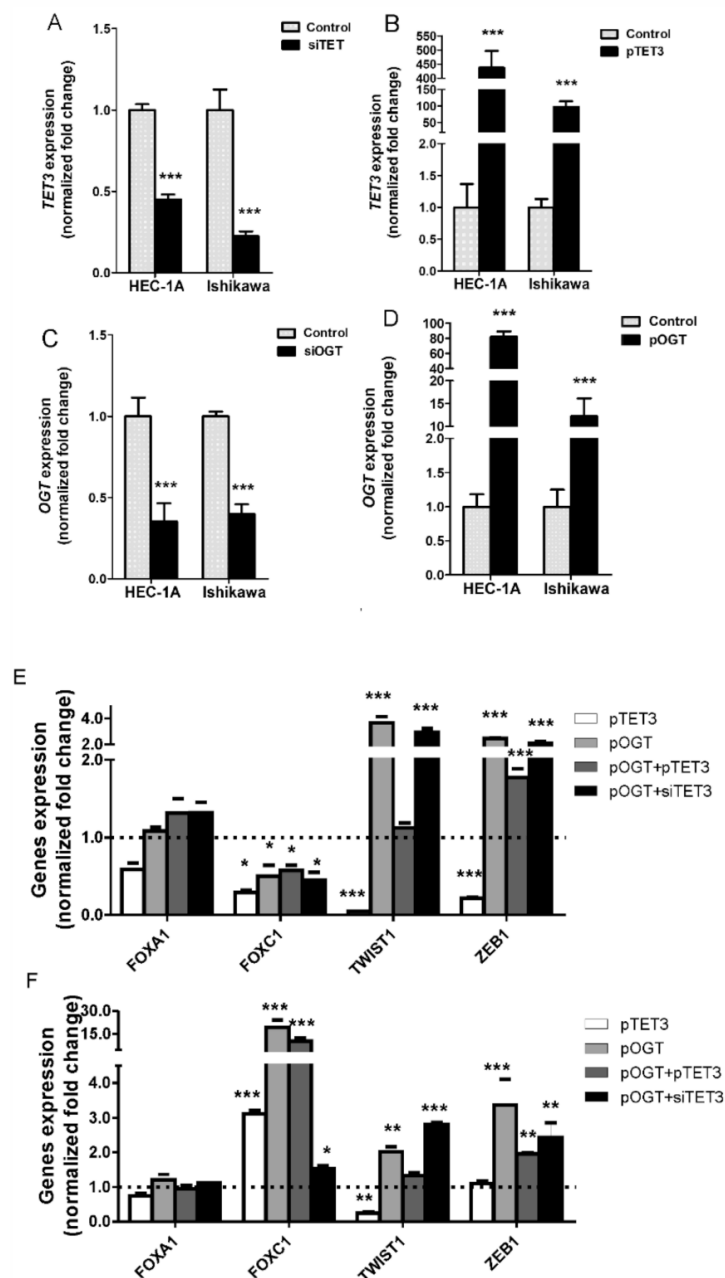


Figure 1. Gene expressions in cells with TET3 and OGT dysregulation. In HEC-1A and Ishikawa cells, TET3 (A) and OGT (C) expression were decreased by transfection of cells with specific siRNA or increased via transfection with plasmid DNA (B,D) respectively). The mRNA levels were analyzed by real-time PCR methods (for details see Methods). The mRNA expression of *FOXA1*, *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* were evaluated in HEC-1A (E) and Ishikawa (F) cells with increased expression of TET3 (pTET3), OGT (pOGT), co-expression of OGT and TET3 (pOGT + pTET3), and increased expression of OGT and reduced expression of TET3 (pOGT + siTET3). The expressions of genes in each kind of sample were compared to appropriate controls, i.e., cells treated with empty vectors or nonsilent siRNA duplexes in which expression was assumed to be 1. Data show mean $\pm$ SE ($n = 5$), * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

2.2. Amount and Localization of OGT in Endometrial Cancer Cells with TET3 Overexpression

It has been suggested that interactions between TET3 and OGT may impact the stability and intracellular localization of OGT [5]. Thus, the impact of TET3 dysregulation on the expression and localization of OGT in chromatin fraction in endometrial cells was analyzed. In HEC-1A and Ishikawa cells treated with TET3 siRNA or plasmid DNA, the OGT expression was analyzed. The mRNA and protein levels of OGT in cells with TET3 down- and up-regulation did not change (Figure 2A,B). TET3 overexpression did not affect the localization of OGT as well. There was no difference in the global cytoplasmic and nuclear amount of OGT between control cells and cells overexpressing TET3 (Figure 2C). Control cells and cells treated with transcription vector were also fractionated to obtain the chromatin fraction. The results showed enrichment of OGT in chromatin fraction, but TET3 overexpression did not impact OGT localization in chromatin fraction (Figure 2D).

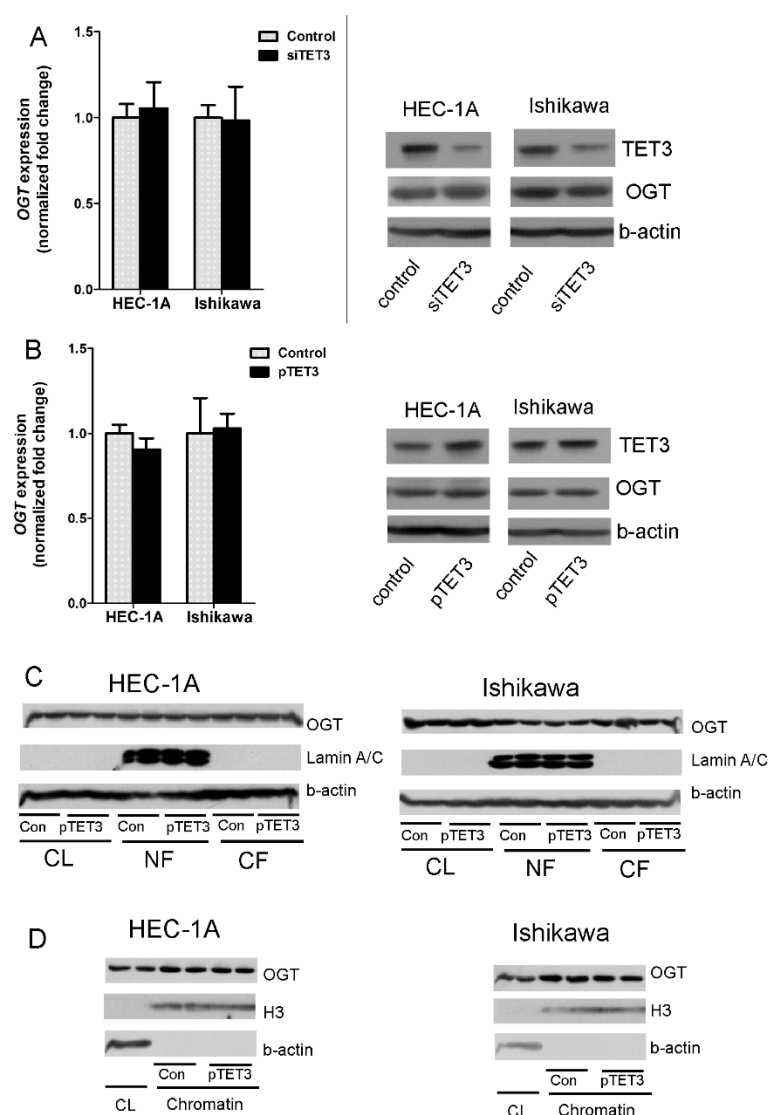


Figure 2. OGT expression and localization in cells with TET3 deregulation. OGT expression was analyzed at mRNA and protein levels in HEC-1A and Ishikawa cells with TET3 reduced (A) or increased (B) expression using the real-time PCR method or Western blot method. (C,D) are the results of OGT identification by Western blot method in cellular fractions in control cells and cells with TET3 overexpression. CL—whole cell lysate; NF—nuclear fraction; CF—cytoplasmic fraction.

2.3. Impact of TET3 and OGT on Each Other Binding to Chromatin and Histones Modifications

Since both TET3 and OGT deregulation had a significant impact on *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* expressions, the binding of TET3 and OGT proteins to chromatin associated with these genes were analyzed. The results showed that both TET3 and OGT bound to chromatin in regions of EMT genes in HEC-1A and Ishikawa cells (Figure 3A,B, respectively). Overexpression of TET3 or OGT in both cells caused increased and siRNA decreased binding to chromatin compared to appropriate control cells. The effect of overexpression or downregulation of OGT and TET3 on each other's amounts in chromatin associated with *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* was analyzed. In HEC-1A cells, the OGT changed significantly the anti-TET3 antibody binding only in the case of *ZEB1*, but TET3 overexpression reduced the anti-OGT antibody binding to chromatin in regions of all three genes. TET3 overexpression in Ishikawa cells was associated with increased binding of the anti-OGT antibody to the region of *FOXC1* and *TWIST1*.

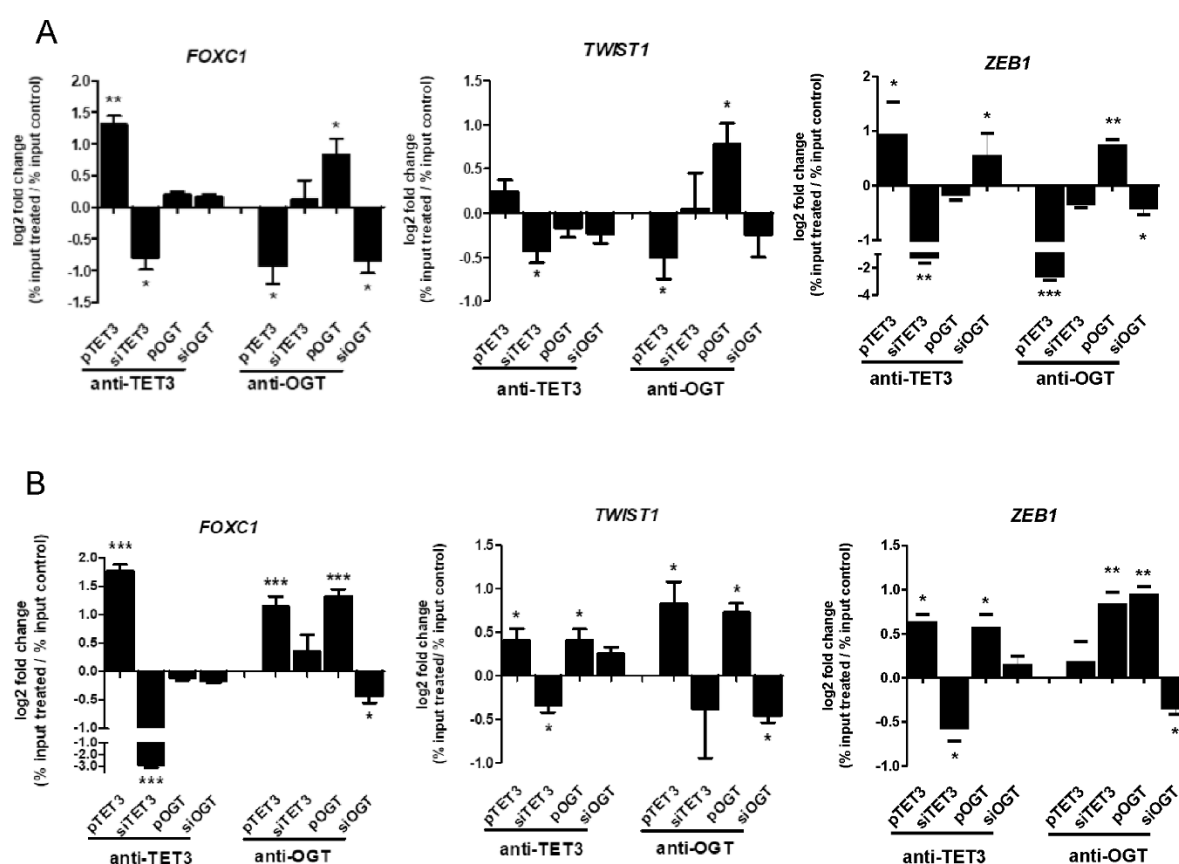


Figure 3. OGT and TET3 binding to chromatin in *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* regions. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed for HEC-1A (A) and Ishikawa (B) endometrial cancer cells treated with plasmid DNA or siRNA with specific antibodies. Differential chromatin enrichment was quantified using real-time quantitative PCR. The results were calculated as % input (% input = % input of specific antibodies probes—% input mock IgG) and are presented as a log2 fold change (Fold change = % input of treated cells sample/% input of control cells sample). Data show mean $\pm$ SE, ($n = 4$) * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

The modifications of histones were analyzed in cells with overexpression of OGT or TET3 (Figure 4). Generally, overexpression of OGT caused increased O-GlcNAcylation of histone H2B and trimethylation of lysine 4 of histone H3 (Figure 4A,D). The only exception was the *FOXC1* region where methylation was decreased after OGT overexpression. The overexpression of TET3 caused generally decreased O-GlcNAcylation and ubiquitination of histone H2B and methylation of histone H3 in the case of all analyzed genes (Figure 4B,F). However, there was also an exception. In Ishikawa cells overexpression of TET3 caused

increased O-GlcNAcylation, methylation, and ubiquitination of histones in chromatin in the *FOXC1* region. Thus, OGT and TET3 had a similar effect on the methylation of H3K4 in HEC-1A and Ishikawa cells. Increased methylation of H3K4 was associated with increased expression of *FOXC1*.

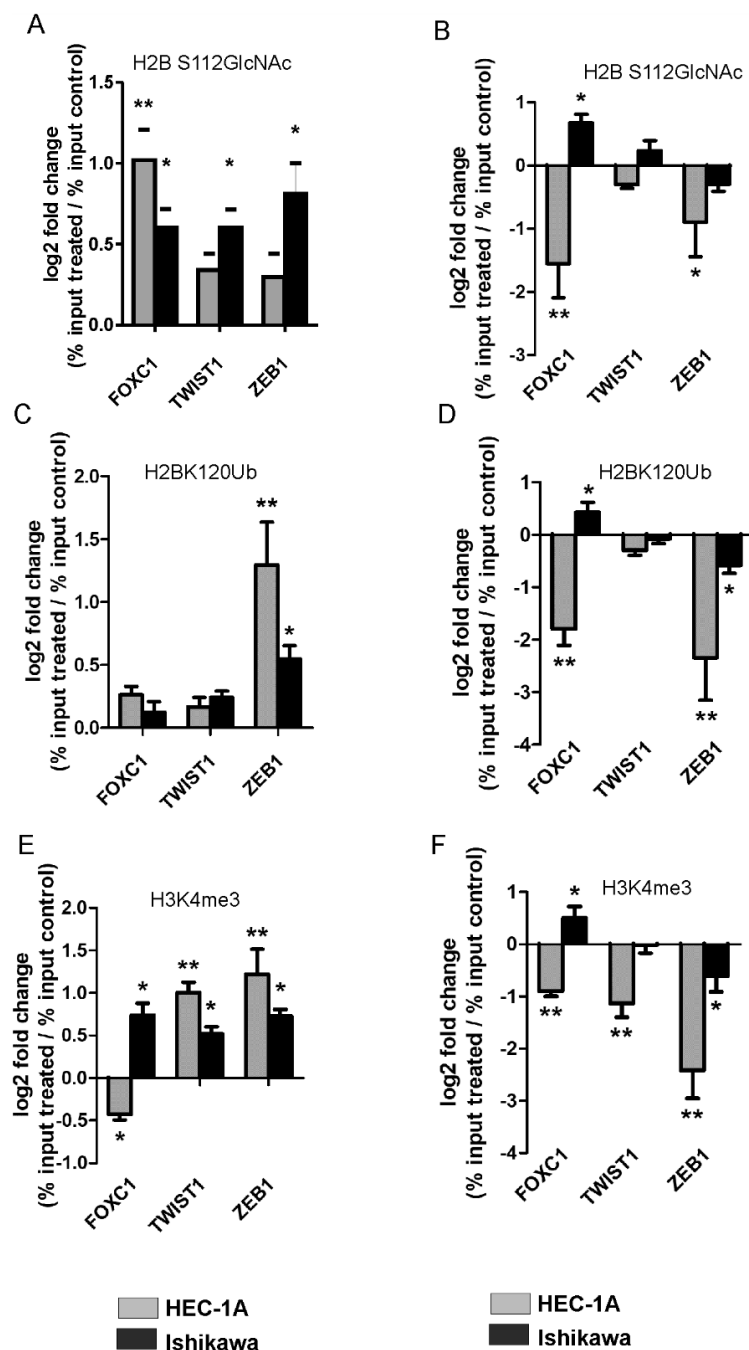


Figure 4. OGT and TET3 dysregulation affect histone modifications. The O-GlcNAcylation of serine 112 of histone H2B (H2BS112GlcNAc), ubiquitination of lysine 120 of histone H2B (H2BK120Ub), and trimethylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) have been analyzed using the ChIP method in cells with OGT (A,C,E) or TET3 (B,D,F) overexpression. Differential chromatin enrichment was quantified using Real-time quantitative PCR. The results were calculated as % input (% input = % input of specific antibodies probes—% input mock IgG) and are presented as a log2fold change (Fold change = % input of treated cells sample/% input of control cells sample). Data show mean $\pm$ SE, ($n = 5$) * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

2.4. OGT and TET3 Affect Migration and Invasion of Endometrial Cancer Cells

Wound healing and Boyden chamber assays were conducted to evaluate the migration and invasion capacity of endometrial cancer cells with overexpression of OGT and TET3 (Figure 5). Interestingly, the effect of TET3 and OGT overexpression was opposite in HEC-1A and Ishikawa cells. In HEC-1A cells, the overexpression of TET3 and OGT caused decreased migration and invasion. The migration potential of Ishikawa control cells was very small, and it was slightly increased after OGT or TET3 expression. The results of Boyden chamber assays showed that both migration and invasion of cells were significantly increased after coexpression of OGT and TET3.

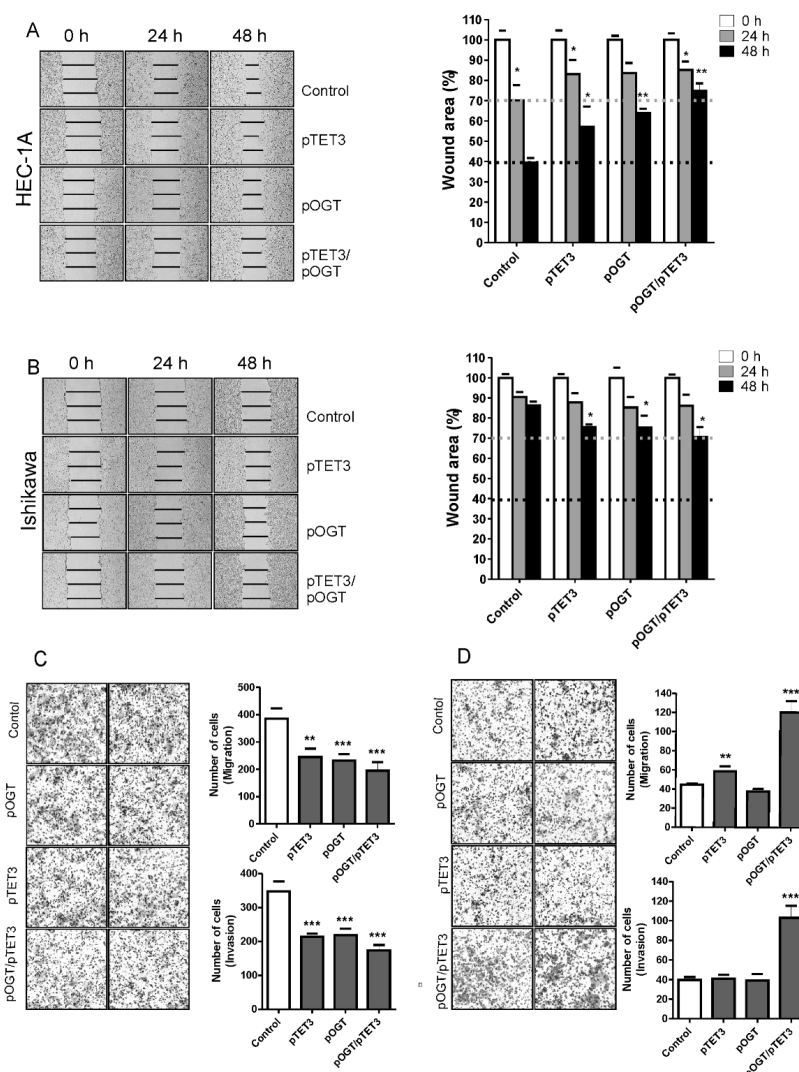


Figure 5. Effect of OGT and TET3 on migration and invasion of cells. The wound-healing assay was performed to examine the migration rate of HEC-1A (A) and Ishikawa cells (B) transduced with OGT and TET3 plasmid vectors. Photographs were taken at 0, 24 h, and 48 h following the initial scratch. Migration rates were quantified by measuring three different wound areas. Three separate experiments were performed. Cell migration assays using Transwell chambers and invasion assays using Transwell chambers with Matrigel were performed for HEC-1A (C) and Ishikawa cells (D). Representative images of migrating cells stained with Giemsa are displayed (left) for HEC-1A (C) and Ishikawa cells (D). Quantitative data of migration and invasion assay are expressed relative to the migration and invasion abilities of control cells. Plots show average counts from three independent testings * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

2.5. Correlations between Expression of EMT Genes and OGT or TET3 in Endometrial Cancer

To further investigate whether OGT and TET3 were associated with the expression of EMT genes in endometrial cancer, we analyzed the correlations between these gene expressions in 131 samples of endometrial cancer tissues using quantitative PCR. The results showed a significant moderate correlation between OGT expression and *TWIST1* ($r = 0.427$) or *ZEB1* ($r = 0.479$) (Figure 6). There was also a weak correlation between TET3 and *FOXC1* ($r = 0.229$) and *TWIST1* ($r = 0.247$) (Figure 6).

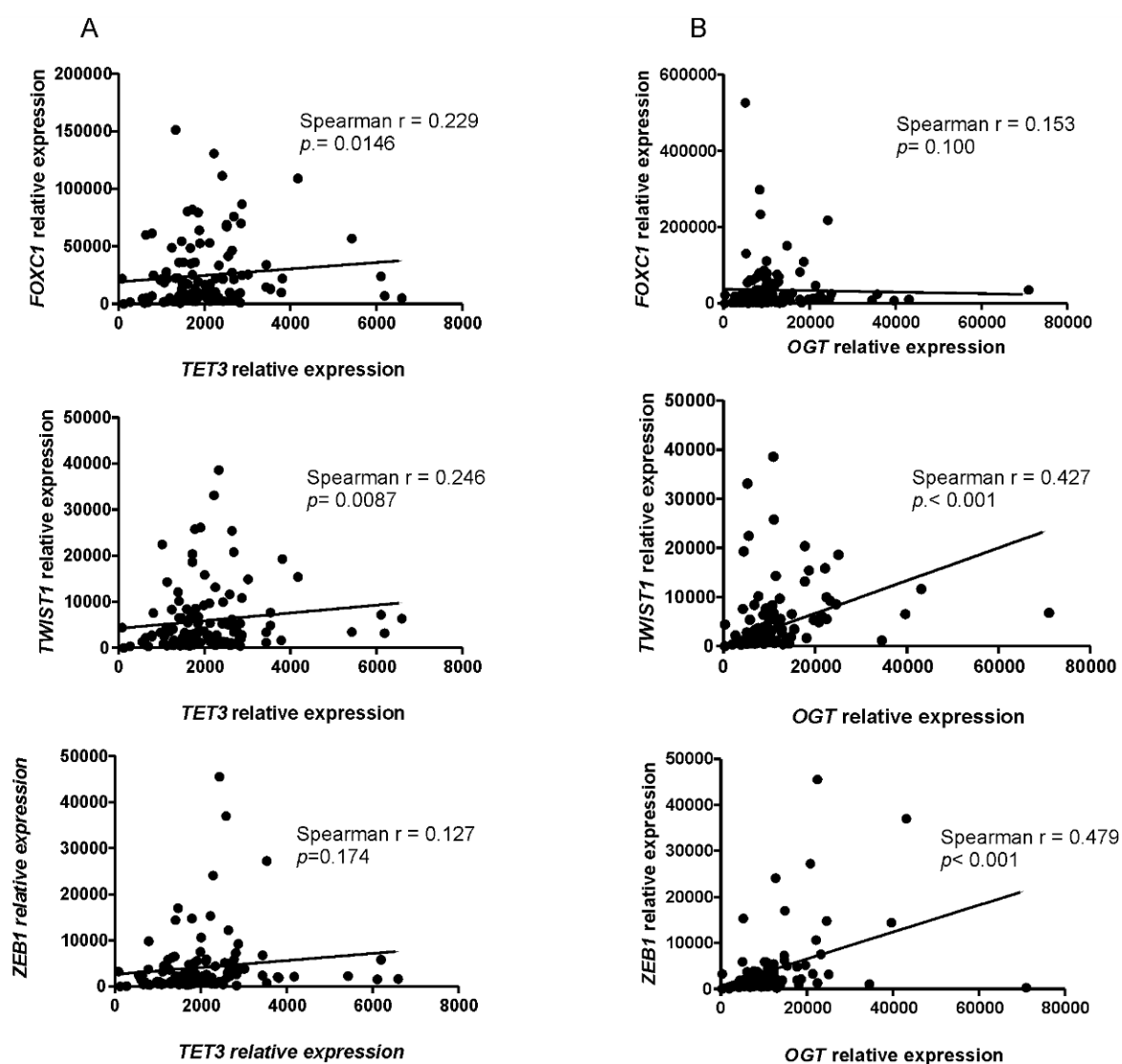


Figure 6. Correlations between gene expressions in endometrial cancer samples. Expression levels of TET3, OGT, FOXC1, TWIST1, and ZEB1 in samples of endometrial cancers were evaluated by real-time quantitative PCR analysis with the *HPRT1* gene applied as a reference. Spearman rank correlation analysis was performed to analyze the association of TET3 (A) or OGT (B) expression with FOXC1, TWIST1, and ZEB1. The correlations were considered significant when $p < 0.05$.

3. Discussion

Most earlier studies of TET proteins focused on their ability to facilitate DNA demethylation through the production of 5-hmC. It has only recently been recognized that TET proteins can also affect chromatin modifications and gene expressions independently of their enzymatic activity. It is suggested that individual TET proteins via interactions with other proteins may indirectly change the expressions of specific genes [17]. Moreover, the individual TET proteins may have a different impact on cancer onset and progression.

TET1 decreased expression and low 5-hmC levels are frequently observed in many different types of cancers, including gastric, prostate, liver, lung, and breast cancer as well as glioblastoma and melanoma [18]. The TET2 gene is subjected to frequent somatic mutations in an extensive range of hematopoietic cancers, including myeloid and lymphoid cancers and several solid cancers [19]. In contrast to decreased expression of TET1/2 in cancers, it was found that TET3 expression was upregulated in ovarian cancer, and its high expression was correlated with poor clinicopathological features [20]. Our previous studies showed that TET1 and TET2 messenger RNA expression was lower and TET3 expression was higher in endometrial cancers compared to normal tissues [21]. A positive correlation between 5-hmC and the relative expression of TET1 and TET2 was found, but no correlation was observed in the case of TET3 [21]. Thus, the role of TET3 in endometrial cancer seems to be different than TET1 or TET2, and this protein may be involved in modifications of histones by targeting other proteins to chromatin. It has been suggested that O-GlcNAc transferase is one of the TET3 partners [5].

In this study, we analyzed the impact of TET3 and OGT on migration and invasion of endometrial cancer cells via regulation of EMT genes expression. Our results show that both TET3 and OGT affect cell migration and invasion of endometrial cancer cells; however, unexpectedly, their effects are different in HEC-1A and Ishikawa cells. Ishikawa cells are well-differentiated and their migratory potential is low. TET3 and OGT overexpression caused an increase in the migratory potential of Ishikawa cells, which was especially seen when both proteins were coexpressed. Increased expression of TET3 and OGT caused a significant increase of *FOXC1* expression. Interestingly, increased expression of TET3 caused increased binding of OGT to chromatin in the region of *FOXC1* and increased histone H2B O-GlcNAcylation and H3K4 trimethylation. This may suggest that TET3 plays a role in the targeting of OGT to chromatin in Ishikawa cells. Although our results did not show general enrichment of OGT in chromatin fraction after TET3 overexpression, that did not exclude the possibility that TET3 is involved in the targeting of OGT to specific chromatin sites. HEC-1A cells, contrary to Ishikawa, showed decreased migratory potential after TET3 and OGT overexpression. Interestingly, in these cells, *FOXC1* expression was decreased after TET3 or OGT overexpression. We cannot explain the reason for different TET and OGT impacts on *FOXC1* in the two cell lines. Both cell types represent type I endometrial cancer. Traditionally, endometrial cancer has been divided into two subtypes with distinct clinical, pathological, histological, and molecular behavior. Type I endometrial carcinomas account for 85% of all endometrial cancers, and they are mainly low grade, estrogen-dependent, hormone-receptor-positive adenocarcinomas with endometrioid morphology [22]. However, despite many similarities, these two types of cells differ in many ways. For example, Ishikawa cells do not express *PTEN*, and HEC-1A cells are *PTEN*-wild-type. On the other hand, Ishikawa cells expressed all estrogen receptors, and HEC-1A cells lack expression of *ESR1*. Ishikawa cells form more estradiol from estrone than HEC-1A cells [23]. The relationship between ER α and the expression of EMT genes is well established for breast cancer [24]. Thus, we think that the different molecular background lies behind the different effects of TET3 and OGT on *FOXC1*. Future studies are necessary to identify all TET and OGT partners involved in *FOXC1* regulation. Although the impact of TET3 and OGT on *FOXC1* expression in HEC-1A and Ishikawa are opposite, it seems that endometrial cell migration and invasion are correlated with this factor expression. Several studies have linked *FOXC1* activity to the aggressive phenotype in cancer cells, especially in basal-like breast cancer and hepatocellular carcinoma [25]. Although studies of *FOXC1* in endometrial cancer are not advanced, it is suggested that *FOXC1* may be a potential oncogene also in endometrial carcinoma [25]. In endometrial cancer, the downregulation of *FOXC1* by miRNA—specifically miRNA 204 and miRNA 495—caused inhibition of cancer cell growth and migration [26,27]. The results of our research seem to confirm the significance of *FOXC1* in the aggressive phenotype of endometrial cancer cells. However, the analysis of mRNA expression of *FOXC1* in endometrial cancer tissues did not show any association of *FOXC1* expression with clinicopathological characteristics (Supplemental Figure S2).

The findings of this study suggest that OGT and TET have the opposite effect on *TWIST1* and *ZEB1* expressions and histone modifications, both in HEC-1A and Ishikawa cells. OGT increases of O-GlcNAcylation of H4S112 and methylation of H3K4 in the *ZEB1* region, which results in the increased expression of *ZEB1*. On the contrary, TET3 overexpression was associated with decreased O-GlcNAcylation and methylation. OGT overexpression also significantly increased H3K4 methylation and expression of *TWIST1*, while TET3 reduced both methylation and expression. However, the migratory potential of HEC-1A cells was not correlated with the increased expression of *ZEB1* or *TWIST1*. The previous studies of Feng et al. [28] showed that *ZEB1* was related to the metastasis of endometrial cancer. *ZEB1* expression was significantly associated with subtype, grade, myometrial invasion, and lymph node metastases in endometrial cancer [28]. Similarly, Shen et al. [29] also showed significantly higher *TWIST1* expression in patients with type I endometrial cancer compared to normal endometrium, and aberrant *TWIST1* expression was significantly associated with clinical parameters, indicating poor prognosis and shorter patient survival. However, Sadlecki et al. [30] did not find significant associations between the clinicopathological characteristics of endometrial cancer patients and the expressions of *TWIST1*, *TWIST2*, *ZEB1*, and *SNAIL*. Our results also did not show any correlation between *TWIST1* expression and clinicopathological parameters and *ZEB1* expression was even lower in more advanced cancers compared to less aggressive cancers (Supplementary Figures S3 and S4).

Thus, the function of EMT inducers in endometrial cancers needs further explanation. The expression and function of EMT inducers may vary considerably across different cancer types or even cell types depending on the molecular context [31]. For example, *TWIST1* was found to promote metastasis in the breast cancer model but was shown to be dispensable for metastasis in a pancreatic cancer model. Sometimes, factors may have even opposite effects in different tumors. *ZEB2* is associated with metastasis in ovarian, gastric and pancreatic tumors but reduces aggressiveness in melanoma [31].

In conclusion, our results showed that both TET3 and OGT are involved in the regulation of *FOXC1*, *TWIST1*, and *ZEB1* in endometrial cancer and affect cancer cell migration and invasion. These results contribute to the knowledge of the complex mechanism supporting endometrial cancer progression; however, further studies are needed to elucidate the significance of particular EMT inducers in endometrial cancer progression.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Tissue Samples

Samples of endometrial cancer were obtained from 131 patients who underwent surgery in the Department of Gynecological Oncology Copernicus Memorial Hospital (Łódź, Poland). Tissue samples after tumor resection were immediately placed in RNAlater (Ambion®, Carlsbad, CA, USA). Samples were subsequently stored at -80°C until RNA and DNA extraction. All cancer samples were characterized in terms of tumor stage according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) criteria, histological grade, and type, according to WHO classification, and the ability of cancer cells to metastasize to lymph nodes. The investigations were approved by the Bioethical Commissions of the University of Lodz (6/KBBN-UŁ/III/2014).

4.2. Cell Culture and Treatment

Endometrial cancer cell line HEC-1A was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and Ishikawa cells were obtained from the European Collection of Authenticated Cell Cultures (Wiltshire, UK). Cells were cultured in DMEM: F12 media (Lonza, Basel, Switzerland) containing 10% (HEC-1A) or 5% (Ishikawa) (*v/v*) FBS at 37°C and 5% CO_2 .

Overexpression of TET3 and OGT was established by transfection of FH-TET3-pEF (#49446, Addgene, Watertown, MA, USA) or pCMV6-OGT-myc (#RC224481, OriGene, Rockville, MD, USA) into cells with Lipofectamine™2000 (Invitrogen™, ThermoFisher

Scientific, Grand Island, NY, USA). For controls, empty vectors were used. Knockdown experiments were performed using Silencer Select siRNA (ID: s47238 ID: s16093) (Ambion®, Carlsbad, CA, USA). To knockdown TET3 or OGT siRNA targeting both genes were complexed to Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's specifications. The siRNAs were used at a concentration of 30 nM. Cotransfection was performed with Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY, USA). Similar to single transfection in co-transfection experiments, the concentration of siRNA was 30 nM and the ratio of DNA to Lipofectamine was 1:2. The effect was analyzed 24 h after transfection.

4.3. RNA Isolation and RT-PCR

Total RNA from cancer tissue samples was isolated using Trizol® Reagent (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and from cells using the ExtractMe Total RNA Kit (Blirt, Gdańsk, Poland) according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNAs were obtained by reverse transcription of 2 µg of total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's protocol. Real-time amplification of the cDNA was performed using TaqMan® Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The fluorogenic, FAM-labeled probes, and the sequence-specific primers for TET3, OGT, FOXA1, FOXC1, TWIST1, and ZEB1, and the internal control HPRT1 were obtained as inventoried assays: Hs00379125_m1, Hs01023894_m1, Hs00559473_s1, Hs01379963_m1, Hs01379963_m1, and Hs02800695_m1 (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). PCR reactions were carried out using the Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hamburg, Germany). The equation $1000 \times 2^{-\Delta Ct}$ was applied to calculate the expression of studied genes in tissue samples, where $\Delta Ct = Ct$ of the target gene – Ct the reference gene (HPRT1). Results are expressed as a number of target gene mRNA copies per 1000 copies of HPRT1 mRNA. Fold differences in genes expression in cells normalized to HPRT1 levels were calculated using the formula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

4.4. Isolation of Cytoplasmic, Nucleoplasmic, and Chromatin Fractions

Cytoplasmic, nucleoplasmic, and chromatin fractions were prepared from a pellet of cultured cells according to Yu et al. [32]. Cells were resuspended in lysing buffer (10 mM HEPES (ang. (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)) pH 7.4, 10 mM KCl, 0.05% Triton X-100). After centrifugation at 14,000 rpm (4°C), 10 min supernatant containing cytoplasmic proteins was moved to new Eppendorf probes and pellet containing nuclear proteins after washing with lysing buffer was resuspended in a low salt buffer (10 mM TrisHCl pH 7.4, 0.2 mM MgCl₂, 1% Triton X100). After centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, supernatant containing nucleoplasmic proteins was moved to new Eppendorf probes and pellet with chromatin proteins was resuspended in 0.2 M HCl. Supernatant obtained after centrifugation contained chromatin proteins.

4.5. Chromatin Immunoprecipitation

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed for HEC-1A and Ishikawa endometrial cancer cells treated with plasmid DNA or siRNA. Following treatment, cells were cross-linked for 10 min with formaldehyde at room temperature; the cross-linking was stopped by adding glycine at a final concentration of 125 mM. Cells were washed and lysed in lysing buffer (10 mM HEPES, 85 mM KCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF). After centrifugation (700 rpm, 4 °C, 2 min), nuclei in pellet were resuspended in high salt buffer and sonicated on ice using Vibra Cell TM model VCX-130 (Sonics & Materials Inc. Newtown, CT, USA). The chromatin fragments were then immunoprecipitated with specific antibodies. The following antibodies were used: anti-OGT (#5368; Cell Signaling Technology), anti-TET3 [C3] C-term (GTX121453, GeneTex Irvine, CA, USA), anti-Histone H2B (glcnac S112) (ab130951; Abcam, Cambridge, UK), anti-Ubiquitinyl-Histone H2B (Lys120) (D11) XP® (#5546, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and

anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys4) (C42D8) (#9751, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A control immunoprecipitation using IgG was set up in parallel to distinguish nonspecific precipitation. The anti-Normal Rabbit IgG (#2729, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) antibody was used. Protein A/G Plus agarose beads were used to bind protein–antibody complexes. Differential chromatin enrichment was quantified using real-time quantitative PCR. The primer pairs were: for FOXC1 forward ATGCCGATTGATTACAGAC and reverse ATTACTGCTTAAGTGTGTC, for TWIST1 forward CTAGATGTCATTGTTTCCAGAG and reverse CCCTGTTTCTTTGAATTTGG, for ZEB1 forward AAAGATGATGAATGCGAGTC and reverse TCCATTTTCATCATGACCAC. The results were calculated as % input (% input = % input of specific antibodies probes – % input mock IgG) and are presented as a fold change (FC = % input of treated cells sample/% input of control cells sample).

4.6. Western Blotting

Endometrial cancer cells were lysed in a RIPA buffer (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF). Concentrations of protein were determined using the Lowry method. Proteins of the cell lysates were resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to Immobilon P membranes. The blots were incubated for two hours at room temperature with the following primary antibodies: anti-OGT (#5368) (diluted 1:2000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-lamin A/C (sc-376248) (diluted 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-Histone H3 (ab1791) (diluted 1:2500; Abcam), and anti- β -actin (sc-4778) (diluted 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). After washing with TBST (Tris buffered saline with Tween-20), immunoblots were incubated 1 h at room temperature with goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (diluted 1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

4.7. Migration/Invasion Assay

The Transwell assay was performed to assess the rate of migration or invasion of HEC-1A and Ishikawa cells after treatment. Cell culture inserts Millicell™ (polyethylene terephthalate PET membranes with 8 μ m pores) (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) were used. Cells were plated in serum-free medium 24 h after treatment and placed in the upper chamber. The lower chamber was filled with serum-containing medium. Cells were cultured for 24 h. After that, cells in the upper chamber were removed, and migrated cells at the bottom of the inserts were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Giemsa. In case of invasion, assay chambers were coated with Matrigel® Matrix Basement Membrane (Corning, New York, NY, USA).

4.8. Statistical Analysis

Differences between the expression levels of genes among the studied tissue sample groups were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test with the post-hoc Dunn test. Correlations between different gene expressions were analyzed using the Spearman test. The Student's paired *t*-test was used to compare the differences between treated and control cells. A *p*-value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22413239/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, A.K. and P.C.; methodology, P.C., P.J. and E.F.; investigation, P.C., P.J. and E.F.; writing—original draft preparation, P.C. and A.K.; writing—review and editing, A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from the National Science Centre of Poland UMO-2015/19/N/NZ3/01311.

Institutional Review Board Statement: The investigations were approved by the Bioethical Commissions of University of Lodz (6/KBBN-UŁ/III/2014).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Guo, J.U.; Su, Y.; Zhong, C.; Ming, G.L.; Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **2011**, *145*, 423–434. [\[CrossRef\]](#)
- Ito, S.; Shen, L.; Dai, Q.; Wu, S.C.; Collins, L.B.; Swenberg, J.A.; He, C.; Zhang, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **2011**, *333*, 1300–1303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kroeze, L.I.; van der Reijden, B.A.; Jansen, J.H. 5-Hydroxymethylcytosine: An epigenetic mark frequently deregulated in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1855*, 144–154. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, Q.; Chen, Y.; Bian, C.; Fujiki, R.; Yu, X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* **2013**, *493*, 561–564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ito, R.; Katsura, S.; Shimada, H.; Tsuchiya, H.; Hada, M.; Okumura, T.; Sugawara, A.; Yokoyama, A. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells* **2014**, *19*, 52–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhang, Q.; Liu, X.; Gao, W.; Li, P.; Hou, J.; Li, J.; Wong, J. Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 5986–5996. [\[CrossRef\]](#)
- Hart, G.W.; Slawson, C.; Ramirez-Correa, G.; Lagerlof, O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: Roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 825–858. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hanover, J.A.; Chen, W.; Bond, M.R. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2018**, *50*, 155–173. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- de Queiroz, R.M.; Carvalho, E.; Dias, W.B. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front. Oncol.* **2014**, *4*, 132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sakabe, K.; Wang, Z.; Hart, G.W. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19915–19920. [\[CrossRef\]](#)
- Deplus, R.; Delatte, B.; Schwinn, M.K.; Defrance, M.; Méndez, J.; Murphy, N.; Dawson, M.A.; Volkmar, M.; Putmans, P.; Calonne, E.; et al. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *EMBO J.* **2013**, *32*, 645–655. [\[CrossRef\]](#)
- Vella, P.; Scelfo, A.; Jammula, S.; Chiacchiera, F.; Williams, K.; Cuomo, A.; Roberto, A.; Christensen, J.; Bonaldi, T.; Helin, K.; et al. Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 645–656. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tania, M.; Khan, M.A.; Fu, J. Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 7335–7342. [\[CrossRef\]](#)
- Jozwik, K.M.; Carroll, J.S. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 381–385. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Augello, M.A.; Hickey, T.E.; Knudsen, K.E. FOXA1: Master of steroid receptor function in cancer. *EMBO J.* **2011**, *30*, 3885–3894. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gilding, L.N.; Somervaille, T.C.P. The Diverse Consequences of FOXC1 Deregulation in Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 184. [\[CrossRef\]](#)
- Lian, H.; Li, W.B.; Jin, W.L. The emerging insights into catalytic or non-catalytic roles of TET proteins in tumors and neural development. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64512–64525. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lio, C.J.; Yue, X.; Lopez-Moyado, I.F.; Tahiliani, M.; Aravind, L.; Rao, A. TET methylcytosine oxidases: New insights from a decade of research. *J. Biosci.* **2020**, *45*, 21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jiang, S. Tet2 at the interface between cancer and immunity. *Commun. Biol.* **2020**, *3*, 667. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cao, T.; Pan, W.; Sun, X.; Shen, H. Increased expression of TET3 predicts unfavorable prognosis in patients with ovarian cancer—a bioinformatics integrative analysis. *J. Ovarian Res.* **2019**, *12*, 101. [\[CrossRef\]](#)
- Ciesielski, P.; Jóźwiak, P.; Wójcik-Krowiranda, K.; Forma, E.; Cwonda, Ł.; Szczepaniec, S.; Bieńkiewicz, A.; Bryś, M.; Krześlak, A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 1010428317695017. [\[CrossRef\]](#)
- Chang, Z.; Talukdar, S.; Mullany, S.A.; Winterhoff, B. Molecular characterization of endometrial cancer and therapeutic implications. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2019**, *31*, 24–30. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hevir-Kene, N.; Rižner, T.L. The endometrial cancer cell lines Ishikawa and HEC-1A, and the control cell line HIEEC, differ in expression of estrogen biosynthetic and metabolic genes, and in androstenedione and estrone-sulfate metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *234*, 309–319. [\[CrossRef\]](#)
- Voutsadakis, I.A. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J. Clin. Med.* **2016**, *5*, 11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Elia, F.A.; Yan, E.; Walter, M.A. FOXC1, the new player in the cancer sandbox. *Oncotarget* **2017**, *9*, 8165–8178. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chung, T.K.; Lau, T.S.; Cheung, T.H.; Yim, S.F.; Lo, K.W.; Siu, N.S.; Chan, L.K.; Yu, M.Y.; Kwong, J.; Doran, G.; et al. Dysregulation of microRNA-204 mediates migration and invasion of endometrial cancer by regulating FOXC1. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 1036–1045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
27. Xu, Y.Y.; Tian, J.; Hao, Q.; Yin, L.R. MicroRNA-495 downregulates FOXC1 expression to suppress cell growth and migration in endometrial cancer. *Tumour Biol.* **2016**, *37*, 239–251. [[CrossRef](#)]
 28. Feng, G.; Wang, X.; Cao, X.; Shen, L.; Zhu, J. ZEB1 expression in endometrial biopsy predicts lymph node metastases in patient with endometrial cancer. *Dis. Markers* **2014**, *2014*, 680361. [[CrossRef](#)]
 29. Shen, J.; Chen, Q.; Li, N.; Bai, X.; Wang, F.; Li, B. TWIST1 expression and clinical significance in type I endometrial cancer and premalignant lesions: A retrospective clinical study. *Medicine* **2020**, *99*, e23397. [[CrossRef](#)]
 30. Sadłlecki, P.; Jóźwicki, J.; Antosik, P.; Walentowicz-Sadłlecka, M. Expression of Selected Epithelial-Mesenchymal Transition Transcription Factors in Endometrial Cancer. *Biomed Res. Int.* **2020**, *2020*, 4584250. [[CrossRef](#)]
 31. Lu, W.; Kang, Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev. Cell* **2019**, *49*, 361–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 32. Yu, Z.; Huang, Z.; Lung, M.L. Subcellular Fractionation of Cultured Human Cell Lines. *Bio-Protocol* **2013**, *3*, e754. [[CrossRef](#)]

Załącznik 3:

‘Supplementary materials’ do Publikacji 2 - Ciesielski, P., Józwiak, P., Forma, E., & Krześlak, A. (2021). **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer.** *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13239. <https://doi.org/10.3390/ijms222413239>

Supplementary materials

TET3 and OGT dependent expression of genes involved in epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer

Ciesielski P, Józwiak P, Forma E, Krześlak A

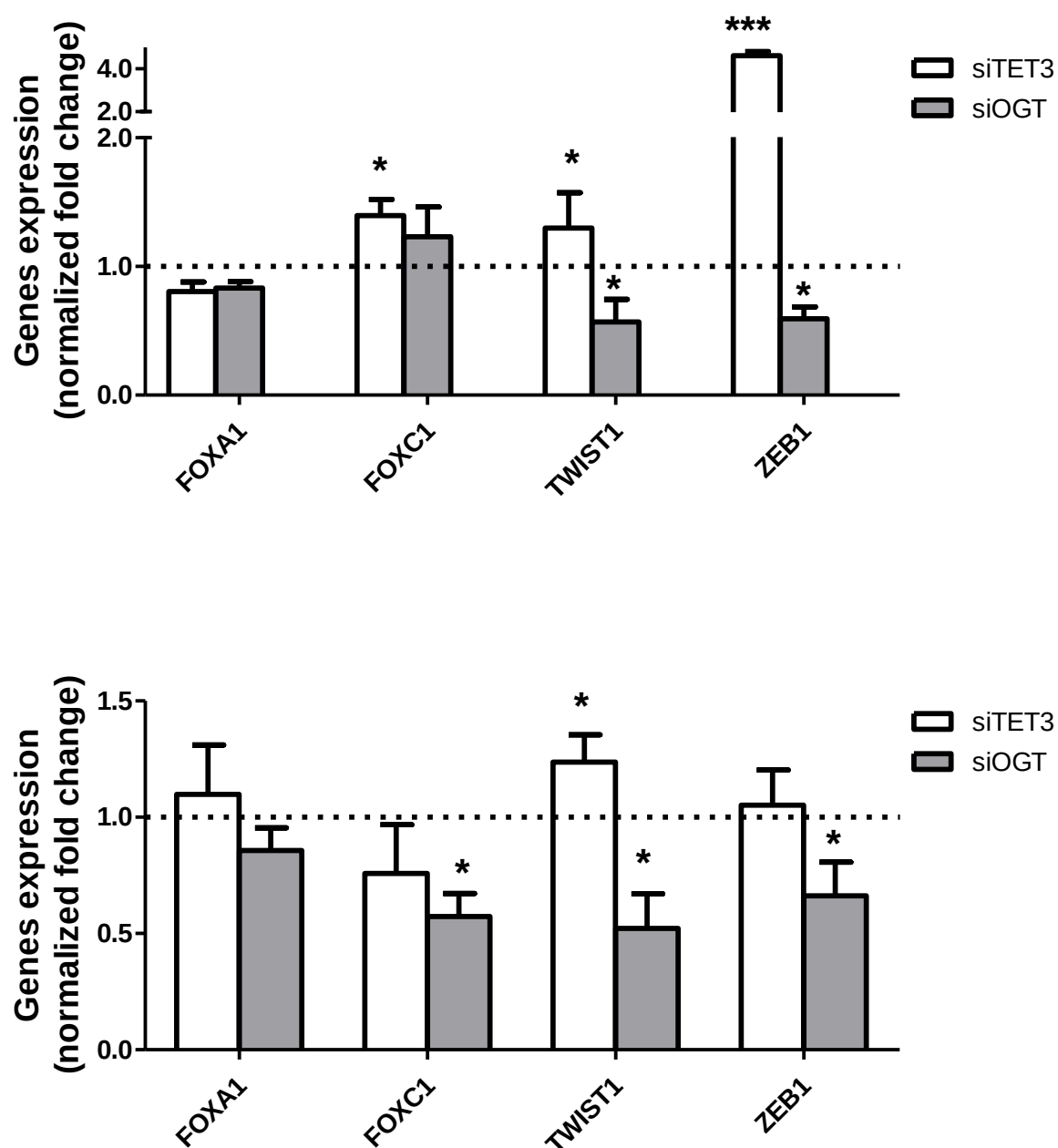


Figure S1. Expression of genes in HEC-1A and Ishikawa cells with TET3 or OGT downregulation. The mRNA levels were analyzed by Real time PCR method. The expression of genes in each kind of samples were compared to controls, i.e. cells treated with non-silent

siRNA duplexes in which expression was assumed to be 1. Data show mean $\pm$ SE(n=5),
 *p<0.01, **p<0.001

Table S1. Characteristics of patients and endometrial cancer samples

Characteristic	Number of patients
Patients age (63.54 $\pm$ 10.16)	131
FIGO stage	
I	87
II	15
III	25
IV	4
Histological grade	
G1	29
G2	81
G3	21
Lymph node metastasis	
Yes	112
No	19

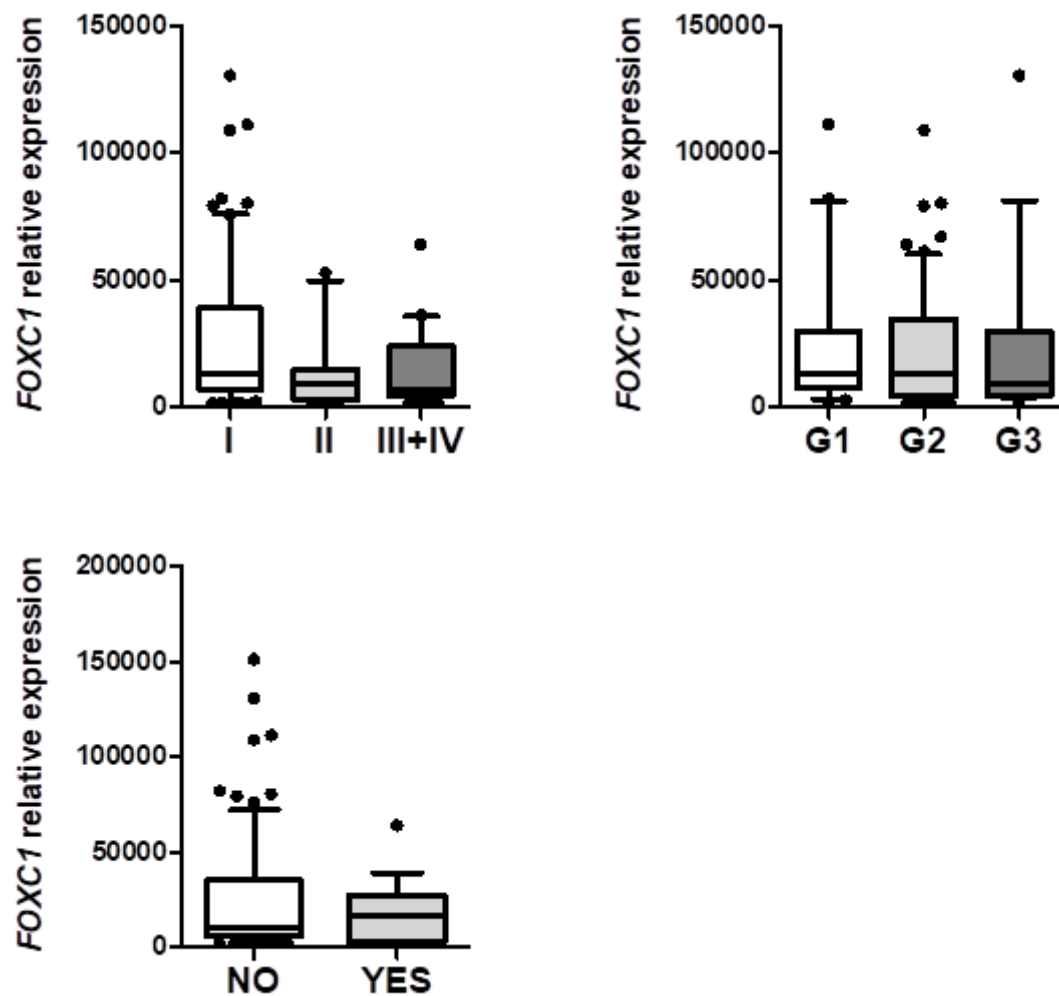


Figure S2. Expression of FOXC1 mean mRNA measured by real-time PCR in endometrial cancer samples; a comparison between subgroups with different FIGO stage, histological differentiation grade, and lymph node metastasis status. The results are shown as number of each FOXC1 mRNA copies per 1000 copies of HPRT1 mRNA (reference gene). Graphs represent mean $\pm$ SEM. The number of cases in each group is shown in Table S1

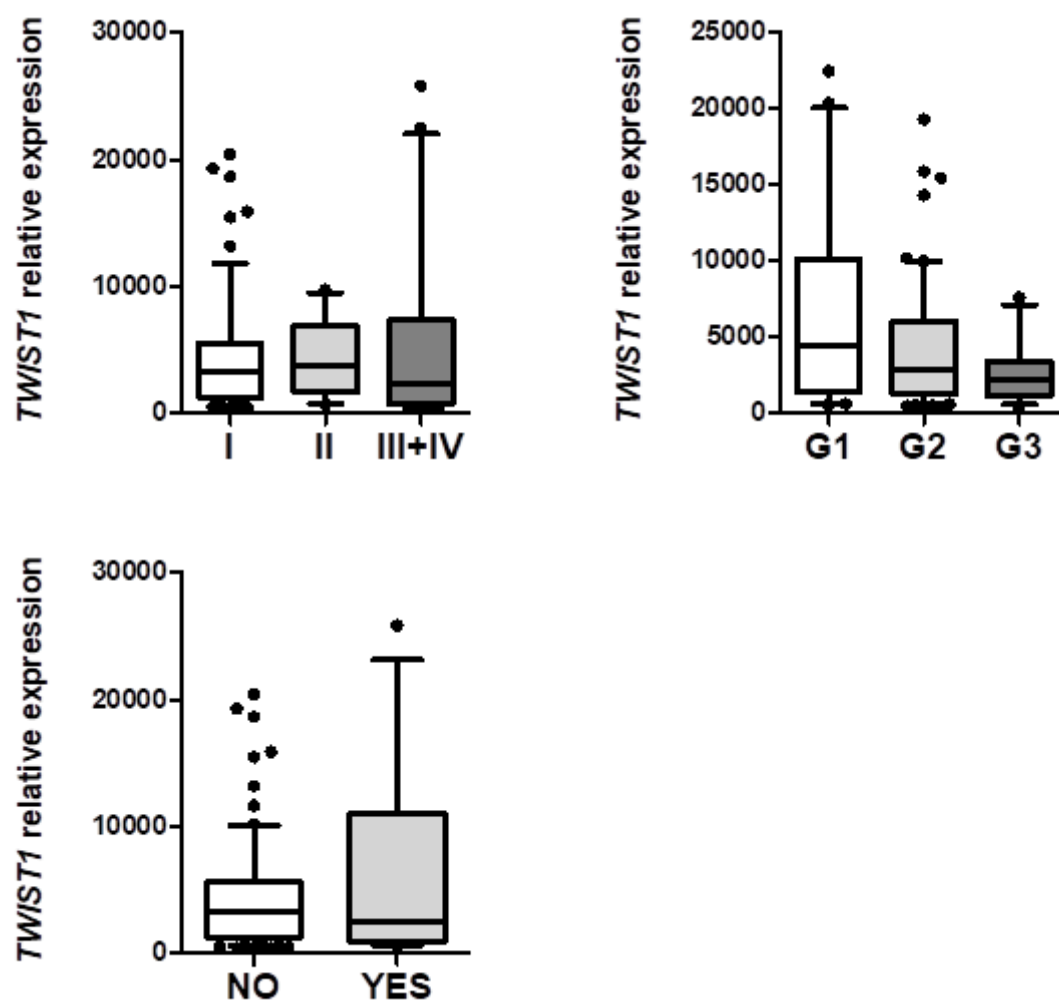


Figure S3. Expression of TWIST1 mean mRNA measured by real-time PCR in endometrial cancer samples; a comparison between subgroups with different FIGO stage, histological differentiation grade, and lymph node metastasis status. The results are shown as number of each TWIST1 mRNA copies per 1000 copies of HPRT1 mRNA (reference gene). Graphs represent mean $\pm$ SEM. The number of cases in each group is shown in Table S1

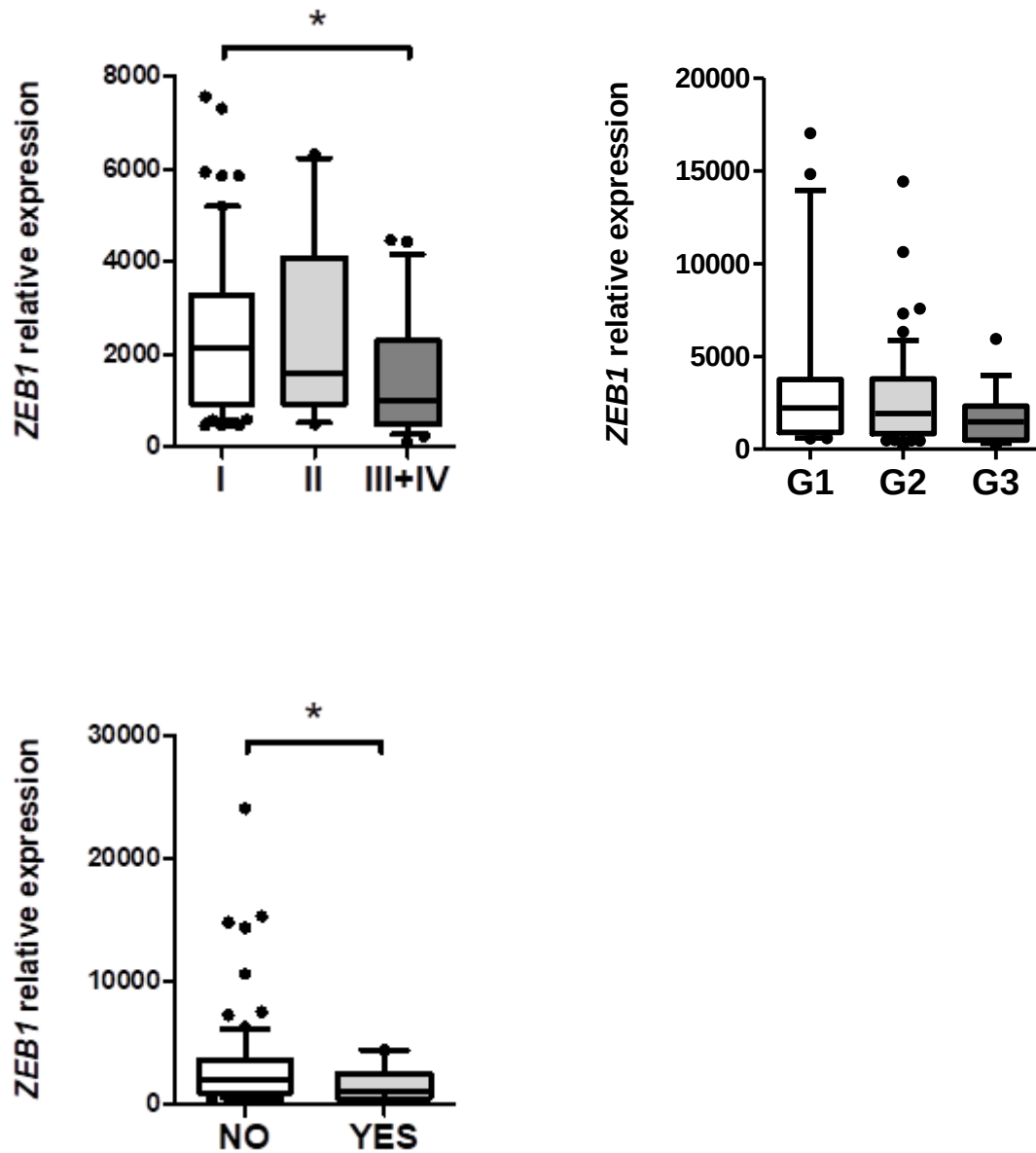


Figure S4. Expression of ZEB1 mean mRNA measured by real-time PCR in endometrial cancer samples; a comparison between subgroups with different FIGO stage, histological differentiation grade, and lymph node metastasis status. The results are shown as number of each ZEB1 mRNA copies per 1000 copies of HPRT1 mRNA (reference gene). Graphs represent mean $\pm$ SEM. The number of cases in each group is shown in Table S1.

Załącznik 4

Wyniki badań, które nie zostały zamieszczone w publikacjach.

Załącznik 4. Wyniki badań, które nie zostały zamieszczone w publikacjach.

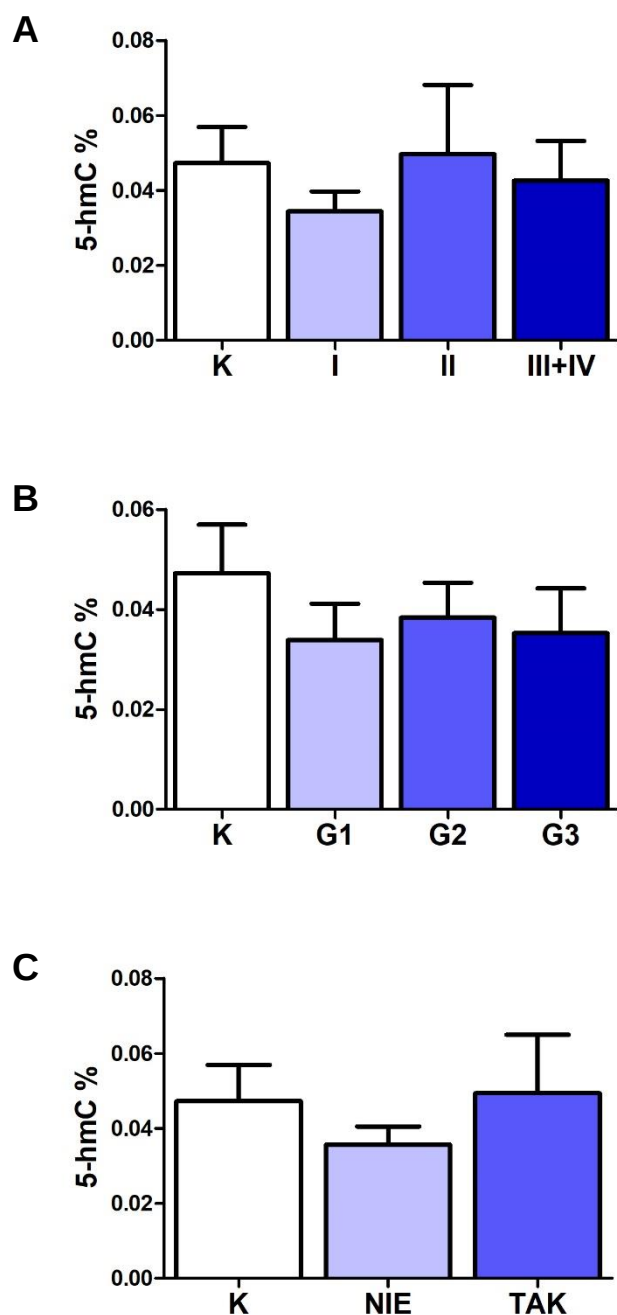


Figure D1. Poziom 5-hydroksymetylocytozyny (5-hmC %) w próbkach raka endometrium; porównanie podgrup o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (A), stopniu zróżnicowania histologicznego (B) i statusie przerzutów do węzłów chłonnych (C). Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM.

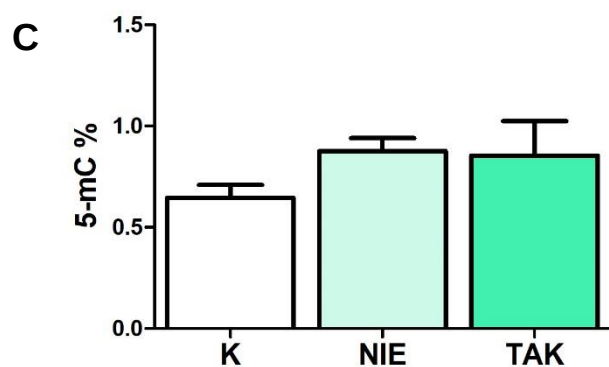
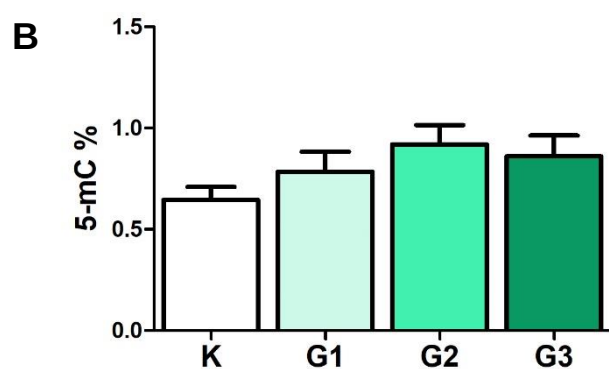
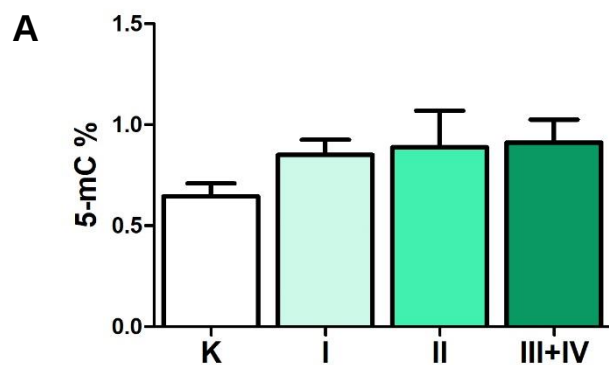


Figure D2. Poziom 5-metylocytozyny (5-mC %) w próbkach raka endometrium; porównanie podgrup o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (A), stopniu zróżnicowania histologicznego (B) i statusie przerzutów do węzłów chłonnych (C). Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM.

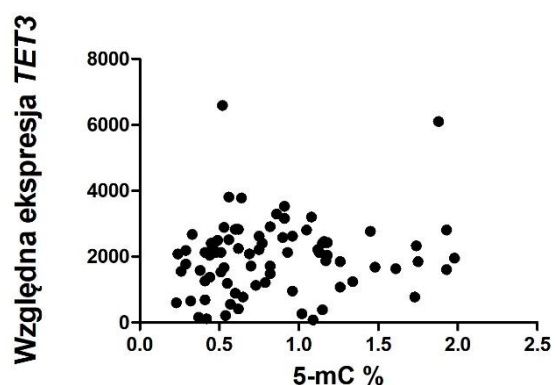
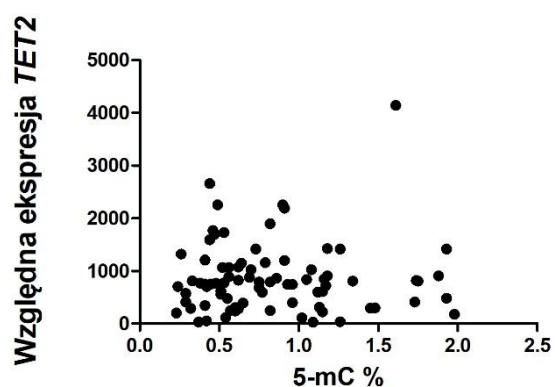
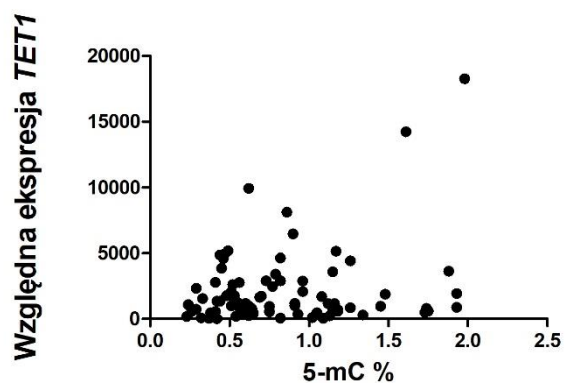


Figure D3. Korelacja pomiędzy ekspresją genów TET a poziomem 5-metylocytozyny (5-mC %). W celu analizy związku ekspresji TET1, TET2 i TET3 z poziomem 5-hmC w próbkach raka endometrium przeprowadzono analizę korelacji rang Spearmana.

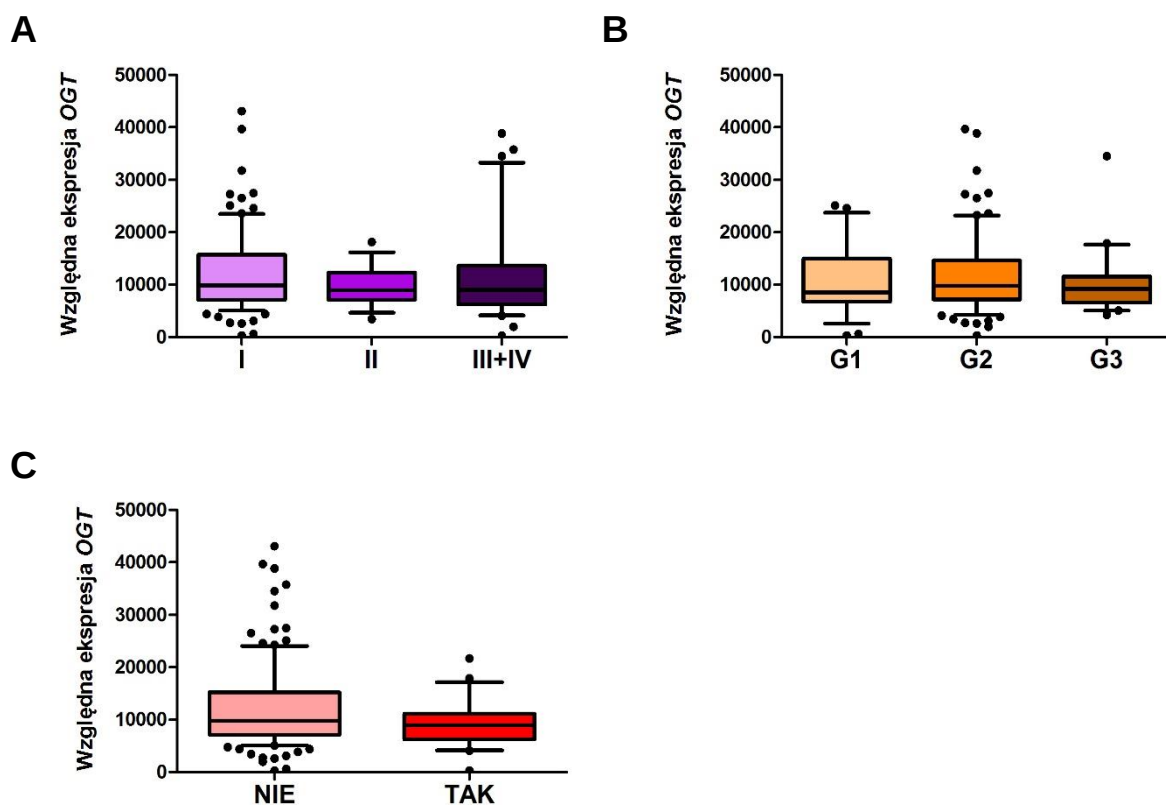


Figure D4. Ekspresja mRNA OGT mierzona metodą real-time PCR w próbkach raka endometrium; porównanie podgrup o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (A), stopniu zróżnicowania histologicznego (B) i statusie przerzutów do węzłów chłonnych (C). Wyniki przedstawiono jako liczbę kopii mRNA OGT na 1000 kopii mRNA HPRT1 (gen referencyjny). Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM.

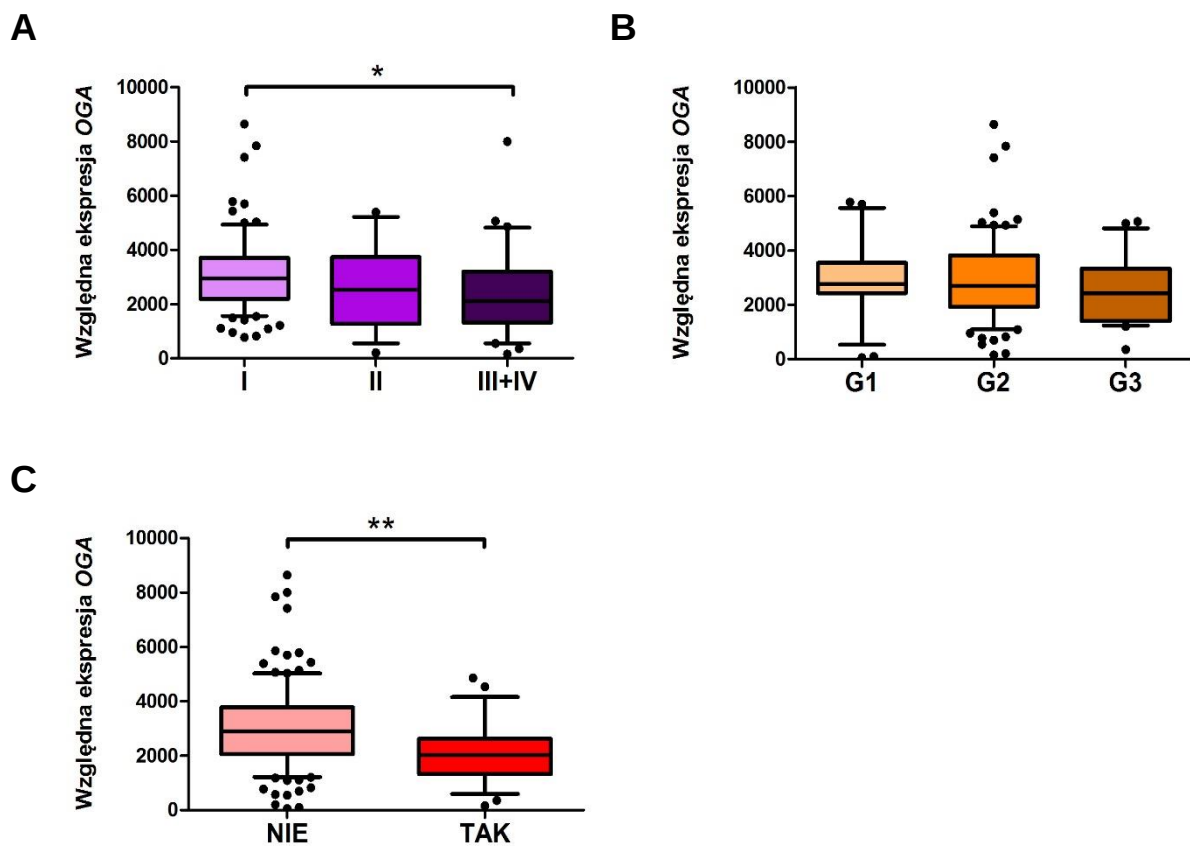


Figure D5. Ekspresja mRNA OGA mierzona metodą real-time PCR w próbkach raka endometrium; porównanie podgrup o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (A), stopniu zróżnicowania histologicznego (B) i statusie przerzutów do węzłów chłonnych (C). Wyniki przedstawiono jako liczbę kopii mRNA OGA na 1000 kopii mRNA HPRT1 (gen referencyjny). Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM.

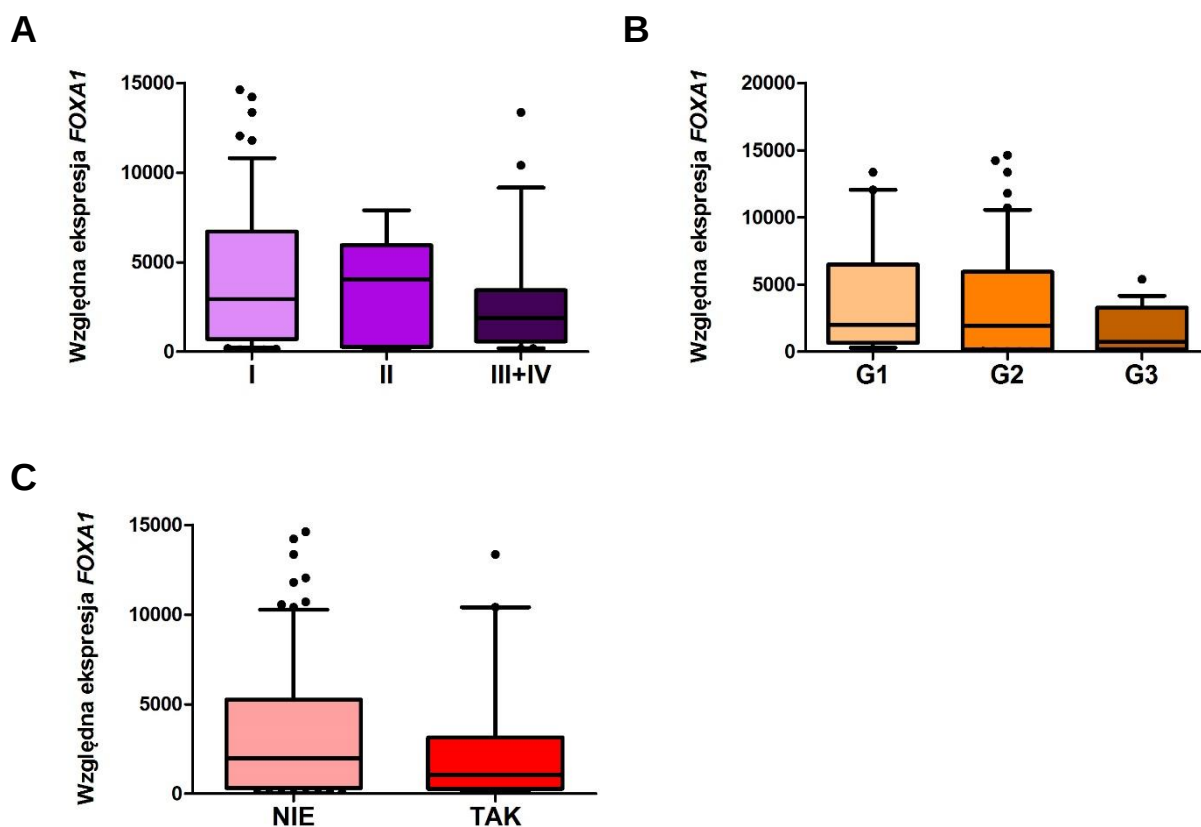


Figure D6. Ekspresja mRNA FOXA1 mierzona metodą real-time PCR w próbkach raka endometrium; porównanie podgrup o różnym stopniu zaawansowania wg FIGO (A), stopniu zróżnicowania histologicznego (B) i statusie przerzutów do węzłów chłonnych (C). Wyniki przedstawiono jako liczbę kopii mRNA FOXA1 na 1000 kopii mRNA HPRT1 (gen referencyjny). Wykresy przedstawiają średnią $\pm$ SEM.

Załącznik 5:

Oświadczenia współautorów

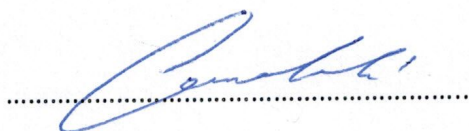
Łódź, 17.05.2024

Mgr Piotr Ciesielski

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Jóźwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. **Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumor Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017** mój udział polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, opracowaniu wyników, analizie statystycznej otrzymanych wyników, przygotowaniu rysunków i przygotowaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 52%.



Podpis

Łódź, 17.05.2024

Dr Ewa Forma

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Jóźwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. **Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumor Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017** mój udział polegał na pomocy w przeprowadzeniu eksperymentów polegających na analizie ekspresji genów w badanych próbach oraz analizie uzyskanych wyników polegających na sprawdzeniu poziomu 5-mC i 5-hmC w DNA wyizolowanym z badanych preparatów. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 6%.


.....

Podpis

Łódź, 17.05.2024

Dr hab. Anna Krześlak, prof. UŁ

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumor Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017** mój udział polegał na pomocy w zaplanowaniu eksperymentów, w analizie uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu i ostatecznym wysłaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 12%.



Podpis

Łódź, 17.05.2024

Prof. Dr hab. Magdalena Bryś

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumor Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017** mój udział polegał na analizie statystycznej uzyskanych wyników w celu określenia korelacji ekspresji genu TET1 na przeżywalność pacjentek z nowotworem endometrium. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 5%.



Podpis

Łódź, 12. 04.2023

Dr n. med. Łukasz Cwonda

II Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumour Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017.** mój udział polegał na zebraniu i opracowaniu charakterystyki materiału klinicznego oraz krytycznym zrecenzowaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 3 %.

dr n. med. Łukasz Cwonda
specjalista położnictwa i ginekologii
2781809

.....

Podpis

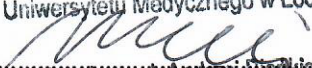
Łódź, 30. 03.2023

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Bieńkiewicz

II Katedra Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej
Szpital im. M. Kopernika w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumour Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017. mój udział polegał na pobraniu i opisanu materiału klinicznego od pacjentów oraz krytycznym zrecenzowaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 5 %.

KIEROWNIK
Oddziału Klinicznego Ginekologii Onkologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

.....Prof. dr hab. n. med. Andrzej Bieńkiewicz.....

Podpis

Łódź, 30. 03.2023

Dr n. med. Katarzyna Wójcik-Krowiranda

II Katedra Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej
Szpital im. M. Kopernika w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumour Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017. mój udział polegał na pobraniu i opisanu materiału klinicznego od pacjentów. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 5 %.



Podpis

Łódź, 12. 04.2023

Dr n. med. Sylwia Szczepaniec

II Oddział Kliniczny Ginekologii Onkologicznej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumour Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017. mój udział polegał na opracowaniu charakterystyki materiału klinicznego. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 2 %.

Sylwia Szczepaniec

Podpis

Sylwia Szczepaniec
dr n. med.
specjalista położnictwa i ginekologii
tel. 577 781 764

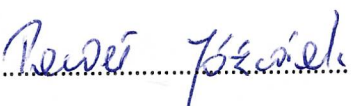
Łódź, 17.05.2024

Dr Paweł Józwiak

Katedra Cytochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Wójcik-Krowiranda K, Forma E, Cwonda Ł, Szczepaniec S, Bieńkiewicz A, Bryś M, Krześlak A. Differential expression of ten-eleven translocation genes in endometrial cancers. Tumor Biol. 2017 39(3):1010428317695017. doi: 10.1177/1010428317695017** mój udział polegał na pomocy w przygotowaniu preparatów do późniejszych eksperymentów oraz pomocy merytorycznej podczas wykonywanych eksperymentów. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 10%.


.....

Podpis

Łódź, 17.05.2024

Mgr Piotr Ciesielski

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Forma E, Krześlak A. TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Dec 8;22(24):13239. doi: 10.3390/ijms222413239** mój udział polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów, opracowaniu wyników, analizie statystycznej otrzymanych wyników, przygotowaniu rysunków i przygotowaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 65%.



Podpis

Łódź, 17.05.2024

Dr Ewa Forma

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Forma E, Krześlak A. TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Dec 8;22(24):13239. doi: 10.3390/ijms222413239** mój udział polegał na pomocy w przeprowadzeniu eksperymentów polegających na określeniu ekspresji genów w badanych próbach oraz analizie uzyskanych wyników. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 5%.

Ewa Forma
.....

Podpis

Łódź, 17.05.2024

Dr hab. Anna Krześlak, prof. UŁ

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Ciesielski P, Józwiak P, Forma E, Krześlak A. **TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Dec 8;22(24):13239. doi: 10.3390/ijms222413239** mój udział polegał na pomocy w zaplanowaniu eksperymentów, w analizie uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu i ostatecznym wysłaniu manuskryptu. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 20%.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Anna Krześlak', written over a horizontal dotted line.

Podpis

Łódź, 17.05.2024

Dr Paweł Józwiak

Katedra Cytobiochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy **Ciesielski P, Józwiak P, Forma E, Krześlak A. TET3- and OGT-Dependent Expression of Genes Involved in Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Cancer. Int J Mol Sci. 2021 Dec 8;22(24):13239. doi: 10.3390/ijms222413239** mój udział polegał na pomocy w przygotowaniu preparatów do późniejszych eksperymentów oraz pomocy merytorycznej podczas wykonywanych eksperymentów. Oświadczam, że mój wkład w powstanie wyżej wymienionej publikacji wynosi 10%.

.....*Paweł Józwiak*.....

Podpis